



Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat

Loïc Lenoir

► To cite this version:

Loïc Lenoir. Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1PP05 . tel-00719693

HAL Id: tel-00719693

<https://theses.hal.science/tel-00719693>

Submitted on 20 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité Nutrition

Soutenue le 11 juillet 2011

par

Loïc LENOIR

**EFFET PROTECTEUR DES POLYPHENOLS DE LA VERVEINE
ODORANTE DANS UN MODELE D'INFLAMMATION COLIQUE
CHEZ LE RAT**

Président : **Pr. Jean-Louis LAMAISON**, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Membres : **Pr. Marie-Paule VASSON**, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
Dr. Catherine FELGINES, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
(Directrice de thèse)
M. Michel DUBOURDEAUX, Laboratoire Biosphère 99, Saint-Bonnet-de-Rochefort

Rapporteurs : **Pr. Norbert LATRUFFE**, Université de Bourgogne, Dijon
Dr. Isabelle HININGER-FAVIER, Université Joseph Fourier, Grenoble
Dr. Stéphanie KRISA, Université Victor Ségalen, Bordeaux

Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie
EA 4233 "Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale"
Université d'Auvergne

*On continue quand même, peut-être parce qu'on sait qu'il faut continuer,
même si on ne comprend plus pourquoi.*

Bernard Moitessier

à mon grand-père.

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury :

Monsieur Jean-Louis LAMAISON, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Mesdames Isabelle HININGER-FAVIER et Stéphanie KRISA ainsi que Monsieur Norbert LATRUFFE d'avoir aimablement accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Madame Marie-Paule VASSON d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement le partenaire industriel, BIOSPHERE 99, pour le soutien financier nécessaire à la réalisation de cette thèse. Je remercie tout particulièrement Monsieur Michel DUBOURDEAUX pour m'avoir confié ce sujet ainsi que pour son suivi et son soutien tout au long de cette thèse.

Je souhaite remercier très chaleureusement Madame Catherine FELGINES, ma directrice de thèse durant ces trois années. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité ton efficacité et surtout ta rigueur scientifique. Merci pour ton aide et ton regard critique qui m'ont été grandement utiles au cours de ma thèse et lors de la rédaction de ce manuscrit. Je ne peux remercier ma directrice de thèse sans y associer Madame Odile TEXIER qui a également été une encadrante précieuse tout au long de ces travaux qui ont réellement été menés en trio. Merci encore à vous pour votre soutien et votre aide, soyez assurées de ma profonde amitié.

Cette thèse s'est effectuée en collaboration étroite entre le laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie dirigé par le Professeur Jean-Louis LAMAISON et le laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition dirigé par le Professeur Marie-Paule VASSON au sein de l'équipe d'accueil « Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale ». Je vous exprime mes sincères remerciements pour votre accueil au sein de vos laboratoires.

Je souhaite également remercier le Professeur Pierre DECHELOTTE de m'avoir accueilli au sein du service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU Estaing de Clermont-Ferrand pour l'ensemble des analyses histologiques réalisées au cours de cette thèse. Soyez assuré de mon profond respect.

A Juliette VERGNAUD-GAUDUCHON ainsi qu'à Adrien ROSSARY, un grand Merci pour votre compétence scientifique et vos nombreux conseils techniques. Merci à tous les deux pour votre disponibilité, votre soutien et votre bonne humeur inébranlable. Ce fut un plaisir.

A Juliette JOUBERT-ZAKEYH, merci pour m'avoir formé à l'analyse histologique et pour tout le temps que tu as pu consacrer à la lecture de mes lames.

Merci à Marie-Chantal FARGES, pour tes nombreux conseils, discussions ainsi que pour ton aide précieuse en expérimentation animale.

Merci à Monsieur Francis RAUL de m'avoir accueilli dans son laboratoire au cours d'une semaine de mobilité à Strasbourg.

Merci à tous les membres de ces deux laboratoires où j'ai passé les trois dernières années, pour tous les bons moments de travail et d'amitié partagés : Didier, Nicolas, Christian, Olivier, Ghislain, Jérémie, Stéphanie et Sandrine. Merci aussi à Dominique, Emmanuel, Danielle et Maguy pour leur aide technique en anapath'.

Merci aux autres étudiants thésards et stagiaires avec qui on partage les galères des manips qui ne fonctionnent pas mais surtout les supers moments à la paillasse ou ailleurs. Je pense à Gwenael (super les manips en chambre froide), à Delphine (gaffe au congélo !) et à Ahlem (bonne chance à toi). Yildiz, enfermée à vie à l'animalerie ! Merci à toi pour ces bons souvenirs avec nos amis les rats, merci pour ta spontanéité et ta joie de vivre et surtout merci pour la « poule mouillée ». Un Merci tout particulier à Bruno, mon acolyte de thèse ! Merci Poulet d'être toujours de bonne humeur, d'avoir partagé les prises de tête quand tout fout l'camp et d'avoir bravé la neige (tout seul quand même) pour mon anniversaire ! Merci à Prisc de te taquiner parce qu'on adore quand vous vous chamaillez ! Merci à tous les deux pour le jogging (ils comprendront, je pense)!

Gwen et Vannes' et leur ménagerie, merci les amis pour tous ces moments ensemble autour d'un lac ou d'un verre... c'était énorme et ça le sera encore ! Changez rien !

Merci, à mes amis escrimeurs, Jenny, Nath', Stephan, N'Doffène, Elisabeth, Jean, Thierry, Catherine, Laurence... pour les nombreux assauts qui vident l'esprit et pour toutes les soirées de rigolade! Merci au Boss Laurent de m'avoir appris qu'un canard est une harmonique, Mazel tov !

Merci à Vinc, Cat, Roxane, Marius, Marion, Danny, Benjamin, Manu, Alex, Maëlle, Sylvain, Anne-Mimi, Bertrand et Anaïs, pour tous ces supers week-ends où on s'éclate toujours autant! Merci de votre soutien permanent ! Quatre ans après la sortie de l'école on est toujours des Jean-Michel et c'est parfait comme ça ! Bises du PaPy !

Julie et Coralie, même si vous êtes loin je sais que vous êtes toujours là, merci !

Besonders möchte ich mich aber bei Nina bedanken, dass sie immer zu mir gehalten hat und in dieser schweren Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatte. Während der letzten Monate hat sie nicht nur meine schlechte Laune, sondern auch den räumlichen Abstand und die Widrigkeiten des Zugverkehrs mit der SNCF ertragen. Danke, Nina, dass Du meine Leidenschaft für das Meer und das Segeln teilst! Ich kann es kaum erwarten Bayern zu besichtigen.

Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin,

Merci Papa et Maman de m'avoir soutenu et écouté avec tout votre cœur au cours de ces années d'études. Vous avez toujours su me montrer le côté positif des choses pour avancer, même quand c'était difficile. Merci d'avoir été des parents aussi disponibles et ouverts à toutes mes envies. Merci enfin de m'avoir transmis votre amour pour la mer.

Merci, Papy, Mamy et Mimie de tout ce que vous m'avez fait partager depuis si longtemps et de votre soutien et intérêt pour ces années d'études.

Et Merci à mon frère Nicolas et à ma sœur Anne-Sophie d'être ce qu'ils sont. Même si vous avez la fâcheuse manie de vous exiler à l'autre bout du monde, vous êtes toujours là pour partager tous les petits et grands moments. Quel plaisir lorsque l'on se retrouve tous les trois !

Sommaire

Résumé	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Liste des communications	<i>iii</i>
Liste des abbréviations	<i>v</i>
Liste des tableaux	<i>viii</i>
Liste des figures	<i>ix</i>
Avant-propos	<i>1</i>
Etude bibliographique	<i>3</i>
I. L'inflammation intestinale	<i>3</i>
A. La réaction inflammatoire : généralités	3
1. Initiation de l'inflammation	3
2. Cytokines et initiation de la phase aiguë de l'inflammation	3
a. Les cytokines	3
b. Réponses induites par les cytokines	4
c. Activation des voies de signalisation	4
d. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation	5
3. La migration leucocytaire	6
B. Le phénomène du stress oxydant : généralités	7
1. Définition	7
2. Les espèces réactives de l'oxygène	7
a. Le radical superoxyde, $O_2^{\bullet -}$	8
b. Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2	9
c. L'acide hypochloreux, HOCl	9
d. Le radical hydroxyle, HO^{\bullet}	10
e. Les radicaux peroxydes	10
3. Les espèces réactives de l'azote	11
4. Les cibles des EROs et des ERAs	11
a. Oxydation des composés lipidiques	11
b. Oxydation des composés protéiques	12
c. Oxydation de l'ADN	13
5. Les systèmes de défense antioxydants	13
a. Les antioxydants non-enzymatiques	14
a.1. Le glutathion	14
a.2. Les vitamines	14
a.3. Autres antioxydants non-enzymatiques	15
b. Les antioxydants enzymatiques	16
b.1. Les superoxyde dismutases	16
b.2. La catalase	17
b.3. Les glutathion peroxydases	17
C. L'inflammation intestinale	19
1. L'appareil digestif	19
a. Organisation générale du tube digestif	19
b. Histologie des structures	19
2. L'immunité intestinale	20
a. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses	20
b. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale : le GALT	21
b.1. Le GALT organisé	21
b.2. Le GALT diffus	22
c. La réponse immunitaire intestinale	22
c.1. L'intégration de l'antigène	22
c.2. La migration cellulaire et l'activation des lymphocytes T	23

c.3. Le retour des lymphocytes T sur le lieu de l'infection	24
c.4. Les immunoglobulines de la muqueuse intestinale	24
3. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales	25
a. Généralités	25
b. Facteurs environnementaux	25
c. Facteurs microbiens	26
d. Facteurs cellulaires	27
4. Marqueurs de l'inflammation intestinale	28
a. La myéloperoxydase	28
b. Les cytokines	28
c. Le facteur de transcription NF- κ B	30
d. La cyclooxygénase-2	31
e. La nitric oxyde synthase inducible	31
5. Stress oxydant et inflammation intestinale	32
a. Augmentation des espèces oxydatives dans l'intestin	32
b. Altérations oxydatives induites lors de l'inflammation intestinale	33
b.1. Oxydation des lipides	33
b.2. Oxydation des protéines	33
b.3. Atteintes oxydatives de l'ADN	34
c. Inflammation intestinale et altérations des défenses antioxydantes	34
c.1. Diminution de l'activité des enzymes antioxydantes	34
c.2. Diminution des taux d'antioxydants non enzymatiques	35
6. Inflammation intestinale chronique et augmentation du risque de cancer colorectal	35
a. Généralités	35
b. Lien entre inflammation intestinale et cancérogenèse	36
c. Implications moléculaires	36
d. Stress oxydant et cancérogenèse	37
D. Les modèles animaux d'étude de l'inflammation intestinale	38
1. Principales caractéristiques du modèle	38
2. Les modèles d'animaux Knock-Out (KO)	39
3. Les modèles de souris et de rats transgéniques	39
4. Les modèles de colites spontanées	40
5. Les modèles de transfert adoptif	40
6. Les modèles d'inflammation inducible	41
a. Induction par instillation d'acide acétique	41
b. Induction par instillation d'iodoacétamide	41
c. Induction par instillation d'haptènes	42
c.1. L'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS)	42
c.2. L'oxazolone	42
d. Induction par administration orale d'indométacine	42
e. Induction par administration orale de sulfate de dextran sodique	43
7. Inflammation colique induite par administration de sulfate de dextran sodique	43
a. Le mode d'action du DSS	43
b. Facteurs influençant l'action du DSS	44
b.1. Le poids moléculaire	44
b.2. La concentration en DSS	44
b.3. La durée d'exposition	45
b.4. Les espèces et les souches animales	45
c. Caractéristiques de l'inflammation induite par le DSS	46
c.1. Les signes cliniques	46
c.2. Les atteintes macroscopiques	47
c.3. Les atteintes histologiques	47
c.4. Un marqueur de l'inflammation intestinale, l'activité myéloperoxydase	48
d. Le profil immunitaire	48
e. DSS et médiateurs de l'inflammation	50
e.1. La production de cytokines	50
e.2. Activation de NF- κ B	51
e.3. COX-2 et iNOS	51
e.4. Marqueurs du stress oxydant	52
e.5. Autres marqueurs	53

II. Les polyphénols, des micronutriments aux effets préventifs	54
A. Généralités sur les polyphénols	54
1. Diversité structurale et sources alimentaires des polyphénols	54
a. Les acides phénoliques	54
a.1. Les acides hydroxybenzoïques	55
a.2. Les acides hydroxycinnamiques	55
b. Les flavonoïdes	56
b.1. Les 4-oxoflavonoïdes	56
- Les flavones	56
- Les flavonols	57
- Les flavanones	57
- Les isoflavones	58
b.2. Les chalcones et dihydrochalcones	59
b.3. Les flavanols et proanthocyanidines	59
b.4. Les anthocyanes	61
c. Les lignanes	61
d. Les stilbènes	62
2. Estimation de la consommation journalière en polyphénols	62
3. Métabolisme des polyphénols	64
a. Sites d'absorption	64
b. Conjugaison des polyphénols	66
4. Biodisponibilité des polyphénols	67
a. Métabolites circulants	67
b. Concentrations plasmatiques	68
c. Distribution dans les tissus et organes	68
d. Voies d'élimination	69
B. Polyphénols et santé	69
1. Propriétés antioxydantes	69
a. Caractéristiques chimiques	70
b. Mesure de l'activité antioxydante des polyphénols	71
2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires	73
3. Polyphénols et cancer	75
4. Polyphénols et pathologies neurodégénératives	78
5. Polyphénols et diabète	79
6. Polyphénols et ostéoporose	80
7. Polyphénols et autres pathologies	80
8. Polyphénols et inflammation	81
C. Polyphénols et inflammation intestinale	82
1. Généralités	82
2. Polyphénols et inflammation : données <i>in vitro</i> sur des lignées cellulaires (cellules intestinales)	83
3. Polyphénols et inflammation intestinale : données chez l'animal	84
a. Polyphénols et aspects cliniques de l'inflammation intestinale	85
b. Polyphénols et protection du côlon	86
b.1. Altérations macroscopiques	86
b.2. Altérations histologiques	86
c. Polyphénols et marqueurs de l'inflammation	87
c.1. Activité myéloperoxydase	87
c.2. Autres marqueurs de l'inflammation	88
d. Polyphénols et modulation de la réaction immunitaire intestinale	88
e. Polyphénols et stress oxydant au niveau intestinal	90
e.1. Les polyphénols limitent la production d'espèces oxydantes	90
e.2. Les polyphénols diminuent l'oxydation des macromolécules	91
e.3. Les polyphénols améliorent les défenses antioxydantes	92
- Le glutathion	92
- Défenses antioxydantes enzymatiques	92
III. L'infusé de verveine odorante	94
A. La verveine odorante : <i>Aloysia triphylla</i>	94
B. Utilisation en médecine traditionnelle	94
C. Composition en polyphénols de l'infusé de verveine odorante	95
D. Propriétés antioxydantes de l'infusé de verveine odorante	95

<i>Objectifs du travail de thèse</i>	97
<i>Matériel et méthodes</i>	99
<i>Etude n°1 (Publication n°1)</i>	109
<i>Etude n°2 (Publication n°2)</i>	124
<i>Etude n°3</i>	158
<i>Discussion</i>	163
<i>Conclusion et perspectives</i>	180
<i>Références bibliographiques</i>	183
<i>Figures et tableaux</i>	208

Résumé

La consommation de polyphénols, micronutriments largement répandus dans les aliments d'origine végétale, a été associée à la diminution du risque de développement de nombreuses pathologies telles que maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives ou cancers. Cet effet des polyphénols s'explique en partie par leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Du fait de leur faible absorption au niveau de l'intestin grêle, les polyphénols sont présents en grande quantité dans le côlon où ils peuvent exercer ces propriétés. L'inflammation intestinale fait interagir le système immunitaire intestinal avec de nombreux facteurs environnementaux et est fréquemment associée à une augmentation du stress oxydant via la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules immunitaires. De nombreuses études ont montré, sur des modèles animaux d'inflammation intestinale, les effets protecteurs de certains polyphénols. La verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) est une plante médicinale connue pour ses vertus thérapeutiques digestives et anti-spasmodiques et couramment consommée en infusion. L'infusé de verveine odorante contient de grandes quantités de polyphénols (acides phénoliques complexes et dérivés de flavones) et ses propriétés antioxydantes ont été mises en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer l'effet d'une consommation préventive d'un infusé de verveine odorante à dose nutritionnelle (40 g/l et 4 g/l) sur le développement d'une inflammation intestinale modérée chez le rat. Des rats Wistar ont consommé comme boisson l'infusé de verveine seul pendant deux semaines puis associé à un agent inflammatoire, le sulfate de dextran sodique (DSS), à 4% pendant 7 ou 9 jours. L'effet de la verveine a été évalué sur différents paramètres cliniques (diarrhée, saignements rectaux, poids corporel), marqueurs de l'inflammation (longueur du côlon, score histologique, activité myéloperoxydase, cytokines) et du stress oxydant (peroxydation lipidique, glutathion, défenses antioxydantes enzymatiques). Les cellules immunitaires ont été identifiées dans le sang ainsi que dans les structures lymphoïdes secondaires par cytométrie en flux. Enfin l'étude du métabolisme des polyphénols en situation inflammatoire ou non a été initiée par l'analyse de l'excrétion urinaire des dérivés polyphénoliques.

Lors d'une inflammation de 7 jours, la consommation préventive d'infusé de verveine à 40 g/l et 4 g/l retarde l'apparition de diarrhée et de saignements rectaux, limite la rétraction du côlon et la diminution de la prise de poids des rats. Malgré l'absence d'effet sur l'activité myéloperoxydase, l'infusé à 40 g/l atténue les altérations histologiques de la muqueuse colique induites par l'inflammation. L'infusé à 4 g/l stimule l'activité de la superoxyde dismutase et réduit la peroxydation lipidique. Les deux infusés modulent les populations de cellules immunitaires dans les structures lymphoïdes secondaires (ganglions mésentériques et plaques de Peyer), en particulier les lymphocytes B et les lymphocytes T cytotoxiques. L'excrétion urinaire des polyphénols de la verveine est faible et n'est pas affectée par l'inflammation. Lors d'une inflammation de 9 jours, les deux infusés limitent l'augmentation d'activité de la myéloperoxydase. Seul l'infusé à 40 g/l limite la rétraction du côlon, stimule l'activité de la glutathion réductase et diminue les taux d'IL-6 et de TNF- α . Ainsi, nous avons montré qu'une consommation préventive d'un infusé de verveine odorante offre des effets protecteurs lors de l'inflammation intestinale en agissant à différents niveaux. L'exploration des voies de signalisation impliquées pourrait permettre de mieux comprendre les effets protecteurs de cette boisson de consommation courante.

Mots clés : Verveine odorante (*Aloysia triphylla*), polyphénols, inflammation intestinale, stress oxydant, immunité, sulfate de dextran sodique, rats.

Abstract

Polyphenols are micronutrients widely distributed in foods of plant origin and their consumption has been associated with a decreased risk of various pathologies such as cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and cancer. This effect of polyphenols is sustained by their antioxidative and anti-inflammatory properties. Due to their poor absorption in the small intestine, high amounts of polyphenols reach the colon where they can exert such properties. Intestinal inflammation results from an interaction between gut immunity and various environmental factors and is frequently associated with an increase of oxidative stress. Numerous studies have shown protective effects of polyphenols in animal colitis models. Lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) is a medicinal herb known for its digestive and antispasmodic properties and is widely consumed as an infusion. Lemon verbena infusion contains large amounts of polyphenols (complex phenolic acids and flavone glycosides) and their antioxidative properties have been shown *in vitro* and *in vivo*.

The aim of the present thesis was to evaluate the effects of a preventive consumption of lemon verbena infusion at nutritional doses (40 g/l and 4 g/l) on the development of a moderate colitis in the rat. Wistar rats ingested lemon verbena infusion alone as a drink for two weeks and then associated with the inflammatory agent dextran sulfate sodium (DSS) at 4% for 7 or 9 days. Effects of lemon verbena were evaluated on several clinical parameters (diarrhoea, rectal bleeding, body weight), inflammatory markers (colon length, histological score, myeloperoxidase activity, cytokines) and oxidative stress markers (lipid peroxidation, glutathione, antioxidative enzymatic defenses). Immune cells were identified in blood and gut associated lymphoid structures using flow cytometry. Moreover, the study of polyphenol metabolism was initiated by the analysis of urinary polyphenol metabolites in healthy and colitis rats.

During a 7 days inflammation, the preventive consumption of lemon verbena infusion at 40 g/l and 4 g/l delays apparition of diarrhoea and rectal bleeding, limits the colon length reduction and the decrease of body weight gain. Despite no effect on myeloperoxidase activity, the 40 g/l infusion attenuates colonic mucosa alterations due to the colitis. The 4 g/l infusion increases superoxide dismutase activity and reduces lipid peroxidation. Both infusions modulate immune cell populations in gut associated lymphoid structures (mesenteric lymph nodes and Peyer patches), especially B cells and cytotoxic T cells. Urinary excretion of lemon verbena polyphenols is low and not modified by inflammation. During a 9 days inflammation, both lemon verbena infusions limit myeloperoxidase increase. Only the 40 g/l infusion reduces colon retraction, increases glutathione reductase activity and reduces colonic IL-6 and TNF- α levels.

Thus, we have shown that the preventive consumption of a lemon verbena infusion provided protection against intestinal inflammation at different levels. Exploration of various signalling pathways could allow better insight into the protective effects of this common beverage.

Keywords: Lemon verbena (*Aloysia triphylla*), polyphenols, colitis, oxidative stress, gut immunity, dextran sulfate sodium, rats.

Liste des communications

Publications :

L. Lenoir, A. Rossary, J. Joubert-Zakeyh, J. Vergnaud-Gauduchon, M.C. Farges, D. Fraisse, O. Texier, J.L. Lamaison, M.P. Vasson and C. Felgines. Lemon verbena tea consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium colitis in the rat. (*Digestive Diseases and Sciences*, mis en ligne le 20 juin 2011)

L. Lenoir, J. Joubert-Zakeyh, O. Texier, J.L. Lamaison, M.P. Vasson and C. Felgines. *Aloysia triphylla* infusion protects rats against DSS-induced colonic damage. (*Journal of the Science of Food and Agriculture*, acceptée sous réserve de modifications)

Communications scientifiques orales ou affichées :

L. Lenoir, A. Rossary, O. Texier, J. Joubert-Zakeyh, J.L. Lamaison, M.P. Vasson, et C. Felgines. L'infusé de verveine odorante atténue le stress oxydant dans un modèle d'inflammation colique induite par le DSS chez le rat. Séminaire CLARA-NACRe, Lyon, 19 mai 2011 (poster).

L. Lenoir, A. Rossary, O. Texier, J. Joubert-Zakeyh, J.L. Lamaison, M.P. Vasson, et C. Felgines. Effets d'une consommation de verveine odorante sur les défenses antioxydantes dans un modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS chez le rat. Séminaire Inter Cancéropôles Cancer, Métabolisme et Nutrition, Dijon, 29-30 avril 2010 (poster) (second prix du poster).

L. Lenoir, A. Rossary, O. Texier, J. Joubert-Zakeyh, J.L. Lamaison, M.P. Vasson, et C. Felgines. Effets d'une consommation de verveine odorante sur les défenses antioxydantes dans un modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS chez le rat. 5^{èmes} Journées Scientifiques du CLARA, Lyon, 30-31 mars 2010 (poster).

L. Lenoir, A. Rossary, O. Texier, J. Joubert-Zakeyh, J.L. Lamaison, M.P. Vasson, et C. Felgines. Effets d'une consommation de verveine odorante sur les défenses antioxydantes dans un modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS chez le rat. 2^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, 9 décembre 2009 (Communication orale).

L. Lenoir, C. Felgines, J. Joubert-Zakeyh, L. Ouchchane, J. Vergnaud, M.C. Farges, M.P. Vasson, J.L. Lamaison, et O. Texier. Intérêt nutritionnel d'un infusé de verveine odorante dans la prévention d'une inflammation colique chez le rat. 26^{ème} congrès annuel de la Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme, Clermont-Ferrand, 25-27 novembre 2009 (Communication orale).

L. Lenoir, C. Felgines, J. Joubert-Zakeyh, L. Ouchchane, J. Vergnaud, M.C. Farges, M.P. Vasson, J.L. Lamaison, et O. Texier. Prévention nutritionnelle de l'inflammation colique : intérêt des polyphénols de verveine. Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, 14-15 mai 2009 (Poster).

L. Lenoir, C. Felgines, J. Joubert-Zakeyh, L. Ouchchane, J. Vergnaud, M.C. Farges, M.P. Vasson, J.L. Lamaison, et O. Texier. Prévention nutritionnelle de l'inflammation colique : intérêt des polyphénols de verveine. 4^{èmes} Journées scientifiques du CLARA, Archamps, 24-25 mars 2009 (Poster).

Liste des abbréviations

8-OHdG	8-oxo-2'-déoxyguanosine
8-OH-G	8-hydroxy-guanine
AA	acide arachidonique
AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropane)
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AFA	alcool-formaldéhyde-acide acétique
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AOM	azoxyméthane
AP-1	activator protein-1
APP	acute phase protein
ATP	adénosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
Bcl2	B-cell lymphoma 2
C3G	cyanidine 3-glucoside
CAC	colitis-associated cancer
CAT	catalase
CCL25	chemokine (c-c motif) ligand 25
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
COMT	catéchol- <i>O</i> -méthyltransférase
COX	cyclooxygénases
CPA	cellules présentatrices d'antigène
CRC	cancer colorectal
CRP	C-reactive protein
DAI	disease activity index
DSS	sulfate de dextran sodique
EGCG	épigallocatechine-3-gallate
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ERAs	espèces réactives dérivées de l'azote
EROs	espèces réactives dérivées de l'oxygène
FAE	follicle associated epithelium
FRAP	ferric reducing ability of plasma
GALT	gut associated lymphoid tissue
GM-CSF	granulocyte macrophage - colony stimulating factor
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion
GSSG	glutathion dissulfide
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HEV	high endothelial venules
HLA-DR	human leucocyte antigen
HO•	radical hydroxyle
HOCl	acide hypochloreux
Hsp60	heat shock protein 60
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN-α/γ	interféron - α/γ
IgA	immunoglobuline A

IgE	immunoglobuline E
IGF-1	insulin like growth factor-1
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M
IKK	I- κ B kinase
IL	interleukine
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IP	intrapéritonal
IκB	inhibitor of κ B
KO	knock-out
LDL	low density lipoprotein
LPH	lactase phloridzine hydrolase
LPS	lipopolysaccharide
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MAP-kinase	mitogen-activated protein kinase
MC	maladie de Crohn
MDA	malondialdéhyde
MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MIP	macrophage inhibitory protein
MMP	métalloprotéinase matricielle
MPO	myéloperoxydase
MRP-2	multiple resistance protein-2
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-IL6	nuclear factor-interleukin 6
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NO•	monoxyde d'azote
NOS	nitric oxide synthases
ONOO-	radical peroxynitrite
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PARP	poly ADP ribose polymerase
PF	poids frais
PGD₂	prostaglandine D2
PGE₂	prostaglandine E2
PGF_{2α}	prostaglandine F2 α
PGI₂	prostaglandine I2
PH-GPx	phospholipid hydroperoxyde glutathion peroxidase
PNA_d	peripheral lymph node addressin
PNN	neutrophiles polymorphonucléaires
PSA	prostate-specific antigen
R•	radical peroxyde
RCH	rectolite hémorragique
RO2•	radical superoxyde
ROOR•	endoperoxyde radicalaire
SAA	sérum amyloïde A
SGLT1	sodium-glucose transport protein-1
sIL-6R	soluble IL-6 receptor
SOD	superoxyde dismutase
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBARs	thiobarbituric acid reactive substances

TCR	T cell receptor
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TNBS	acide trinitrobenzène sulfonique
TNF-α/β	tumor necrosis factor- α/β
TRAP	total radical-trapping antioxidant parameter
TX	thromboxane
UDP-GT	UDP-glucuronosyltransférase
UrH[•]	radical urate
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
α1-AGT	α 1-acide-glycoprotéine
α2-MG	α 2-macroglobuline

Liste des tableaux

Tableau 1.	Modèles animaux d'inflammation colique.
Tableau 2.	Signes cliniques de l'inflammation intestinale dans le modèle DSS chez la souris.
Tableau 3.	Signes cliniques de l'inflammation intestinale dans le modèle DSS chez le rat.
Tableau 4.	Estimation de la consommation en flavonoïdes chez l'adulte dans différents pays.
Tableau 5.	Relation structure-activité antioxydante (mesurée par la méthode TEAC) des polyphénols.
Tableau 6.	Effets des polyphénols sur les marqueurs inflammatoires chez l'individu sain.
Tableau 7.	Effets cliniques des polyphénols des fruits et du thé.
Tableau 8.	Effets des polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation <i>in vitro</i> .
Tableau 9.	Effets des polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation <i>in vivo</i> .
Tableau 10.	Effets d'extraits végétaux riches en polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation <i>in vivo</i> .
Tableau 11.	Gradients d'élution des polyphénols.
Tableau 12.	Grille d'évaluation des atteintes histologiques.
Tableau 13.	Concentration en polyphénols dans l'infusé de verveine odorante consommé le jour des recueils urinaires.
Tableau 14.	Polyphénols consommés les jours de recueil urinaire.
Tableau 15.	Excrétion urinaire des polyphénols avant et après administration de DSS.
Tableau 16.	Bilan d'excrétion urinaire.
Tableau 17.	Numération des leucocytes sanguins.
Tableau 18.	Sous-populations lymphocytaires dans les structures lymphoïdes secondaires.
Tableau 19.	Concentrations en polyphénols des infusés de verveine odorante.
Tableau 20.	Consommation d'infusé de verveine odorante et de polyphénols.
Tableau 21.	Consommation alimentaire et gain de poids corporel.
Tableau 22.	Longueur du côlon et poids des organes.
Tableau 23.	Activité des enzymes antioxydantes dans le côlon.
Tableau 24.	Dosage des cytokines dans le côlon.
Tableau 25.	Comparaison des teneurs et consommations de polyphénols au cours des trois études.

Liste des figures

- Figure 1.** Réaction de la phase aiguë.
Figure 2. Régulation de la production de l'IL-6.
Figure 3. Activation des voies de signalisation par les cytokines pro-inflammatoires et production des protéines de la phase aiguë.
Figure 4. Margination des leucocytes.
Figure 5. Structures du glutathion.
Figure 6. Structures des vitamines A et E.
Figure 7. Structures de la bilirubine (A), de l'acide urique (B) et du coenzyme Q (C).
Figure 8. Vue détaillée de l'appareil digestif humain.
Figure 9. Côlon en coupe transversale.
Figure 10. Coupe transversale de la paroi du côlon en microscopie optique.
Figure 11. Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT).
Figure 12. Représentation schématique de la structure des ganglions mésentériques.
Figure 13. Réponse immunitaire intestinale.
Figure 14. Interaction des lymphocytes activés avec les cellules présentatrices d'antigène initiant l'inflammation intestinale.
Figure 15. Classification des lymphocytes T helper activés. Les sous-populations cellulaires sont déterminées selon les cytokines sécrétées.
Figure 16. Impact des facteurs environnementaux sur le développement des MICI.
Figure 17. Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au cours de l'inflammation intestinale.
Figure 18. Inflammation chronique et mutagenèse.
Figure 19. Développement de la carcinogenèse associée à l'inflammation intestinale.
Figure 20. Relation schématique entre inflammation intestinale, stress oxydant et cancérogenèse.
Figure 21. Réduction de la longueur du côlon induite par le DSS.
Figure 22. Altérations histologiques de la muqueuse colique suite à l'administration de DSS.
Figure 23. Visualisation *in situ* de l'infiltration de la muqueuse colique de souris par les cellules immunitaires lors de l'inflammation induite par administration de DSS.
Figure 24. Classification des polyphénols.
Figure 25. Structure des acides hydroxybenzoïques.
Figure 26. Structure des acides hydroxycinnamiques.
Figure 27. Structure de base des flavonoïdes.
Figure 28. Structure des flavones.
Figure 29. Structure des flavonols.
Figure 30. Structure des flavanones.
Figure 31. Structure des chalcones et dihydrochalcones.
Figure 32. Structure des flavanols.
Figure 33. Structure des proanthocyanidines.
Figure 34. Structure primaire des anthocyanes.
Figure 35. Structure des lignanes.
Figure 36. Structure des stilbènes.
Figure 37. Schéma général du métabolisme des polyphénols.
Figure 38. Structures des polyphénols présents dans l'infusé de verveine odorante.
Figure 39. Mesure de la longueur du côlon.
Figure 40. Fixation du prélèvement de côlon destiné à l'analyse histologique.

- Figure 41.** Section longitudinale du côlon.
- Figure 42.** Méthode de préparation des échantillons pour l'analyse histologique.
- Figure 43.** Fenêtres de quantification des populations leucocytaires par cytométrie en flux.
- Figure 44.** Schéma expérimental de l'étude 1.
- Figure 45.** Analyse HPLC de l'infusé de verveine odorante.
- Figure 46.** Analyse HPLC des urines après consommation de l'infusé de verveine odorante.
- Figure 47.** Activités SOD et GPx dans la muqueuse colique.
- Figure 48.** Schéma expérimental de l'étude 2.
- Figure 49.** Schéma expérimental de l'étude 3.
- Figure 50.** Altérations histologiques de la muqueuse colique.
- Figure 51.** Score histologique de la muqueuse colique.
- Figure 52.** Activité MPO dans la muqueuse colique.
- Figure 53.** Taux de glutathion total, de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG) dans la muqueuse colique.

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Au cours de la dernière décennie, une réelle prise de conscience de l'importance d'une alimentation riche en fruits et légumes est apparue, en particulier dans le cadre de la prévention de maladies métaboliques telles que les pathologies cardiovasculaires, l'obésité ou le diabète de type II. L'importance de la consommation d'aliments d'origine végétale a été particulièrement mise en avant au cours du premier Programme National Nutrition Santé (PNNS) du Ministère de la Santé dans la désormais célèbre injonction « *Pour votre santé, mangez au moins cinq fruits et légumes par jour* ». Une consommation élevée de fruits et légumes a pu être associée à la diminution du risque de développement de maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou de cancer dans de nombreuses études épidémiologiques. De multiples constituants et micronutriments de ces aliments tels que les fibres, les vitamines, les minéraux, jouent potentiellement un rôle dans cet effet protecteur. Les polyphénols sont des micronutriments particulièrement abondants dans les fruits, les céréales et les légumes ainsi que dans des boissons comme le thé, le café, le vin ou les jus de fruits. La consommation moyenne de polyphénols par l'homme est couramment estimée à 1 g par jour. Les effets biologiques des polyphénols ont été évalués dans de nombreuses études et souvent associés à leurs propriétés antioxydantes intrinsèques. Il a été montré *in vitro* que les polyphénols avaient des effets protecteurs sur des modèles de stress oxydant. Les études menées *in vivo* n'ont détecté que de faibles concentrations plasmatiques de polyphénols, insuffisantes pour avoir un effet antioxydant direct. Cependant, de récentes études ont montré que ces micronutriments pouvaient agir indirectement sur le stress oxydant en stimulant l'expression et l'activité des systèmes de défense. Toutefois, il est désormais admis que leurs effets ne se limitent pas à leurs propriétés antioxydantes directes ou indirectes et de récentes données ont suggéré que les polyphénols avaient la capacité d'agir sur l'expression des gènes ainsi que sur de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation. Les études portant sur le métabolisme de ces composés ont montré que les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et qu'ils sont présents en grande quantité dans la lumière du côlon où ils pourraient exercer des effets antioxydants et anti-inflammatoires. L'inflammation intestinale est une réaction complexe faisant interagir le système immunitaire, des facteurs environnementaux ainsi que des prédispositions génétiques. De nombreuses études menées *in vitro* ou sur des modèles animaux se sont intéressées à l'effet

des polyphénols sur l'inflammation intestinale mais peu de données sont actuellement disponibles chez l'homme.

La verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) est une plante médicinale originaire d'Amérique du Sud, introduite et cultivée sur le pourtour méditerranéen. Connue pour ses propriétés digestives et antispasmodiques, elle est couramment consommée en infusion. L'infusé de verveine odorante contient de grandes quantités de polyphénols et des propriétés antioxydantes ont été décrites pour cette boisson. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'effet de sa consommation préventive dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Nous avons ainsi étudié l'effet de la consommation de l'infusé de verveine odorante à deux concentrations sur les différents signes cliniques de l'inflammation colique. Nous avons également évalué les populations de cellules immunitaires impliquées dans le développement de cette réaction inflammatoire. L'inflammation est couramment associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi nous avons également évalué l'effet antioxydant de la consommation de cet infusé. Enfin, nous avons initié l'étude du métabolisme des polyphénols contenus dans cette boisson par l'analyse de leur excrétion urinaire en situation inflammatoire ou non.

La première partie de ce manuscrit constitue une étude bibliographique portant sur (1) l'inflammation et plus particulièrement l'inflammation intestinale et le stress oxydant associé, (2) les polyphénols contenus dans les fruits et les légumes, leurs effets sur la santé et l'inflammation intestinale et (3) la verveine odorante. Après une brève exposition du matériel et des méthodes utilisés, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés puis discutés.

Ces recherches ont été menées au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie au sein de l'équipe d'accueil « Nutrition, Cancérogenèse, Thérapie anti-tumorale » à la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand (Université d'Auvergne). Cette thèse a été financée dans le cadre d'une convention CIFRE avec le Laboratoire Biosphère 99 (Saint-Bonnet-de-Rochefort).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

I. L'inflammation intestinale

A. La réaction inflammatoire : généralités

La réaction inflammatoire est une réponse locale mise en place à la suite d'une lésion ou d'une infection tissulaire. Elle se déroule en trois étapes principales : une augmentation de l'apport sanguin sur le site de l'infection favorisant la migration des leucocytes et des protéines sériques, une augmentation de la perméabilité capillaire favorisant l'exsudation des protéines sériques (anticorps, complément, kininogènes) et une augmentation de la migration leucocytaire dans le tissu (Roitt *et al.* 2002).

1. Initiation de l'inflammation

Une agression par des microorganismes ou une lésion tissulaire induit de nombreuses réponses initiées par le tissu lésé comme la libération de cytokines pro-inflammatoires permettant l'activation du système vasculaire et des cellules immunitaires. Ces réponses sont à leur tour associées à une production accrue de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation qui diffusent dans les fluides extracellulaires et circulent dans le sang (Gruys *et al.* 2005).

2. Cytokines et initiation de la phase aiguë de l'inflammation

a. Les cytokines

Les cytokines sont des peptides de faible poids moléculaire sécrétés par les cellules inflammatoires (neutrophiles polymorphonucléaires et macrophages) et impliqués dans l'initiation, l'amplification et la régulation de la réponse inflammatoire. Elles déclenchent également la synthèse et le relargage dans le plasma des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et sont associées à d'autres molécules de signalisation intra- et extra-cellulaire comme le monoxyde d'azote ou les glucocorticoïdes (van Miert 1995; Gruys *et al.* 2005). Les cytokines ont différents modes d'action : certaines initient et amplifient la réponse, d'autres la soutiennent ou l'atténuent, quelques-unes tendent à arrêter le processus inflammatoire induit par les premières.

On peut ainsi distinguer trois grands groupes de cytokines (Gruys *et al.* 2005) :

- les cytokines agissant comme facteurs de croissance positifs ou négatifs : interleukine-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 et GM-CSF (granulocyte macrophage – colony stimulating factor)
- les cytokines à activité pro-inflammatoire : tumor necrosis factor- α/β (TNF- α/β), IL-1 α/β , IL-6, interféron- α/γ (IFN- α/γ), IL-8 et MIP-1 (macrophage inhibitory protein 1)
- les cytokines à activité anti-inflammatoire : antagoniste du récepteur à l'IL-1, récepteur à l'IL-1 soluble, TNF- α binding protein, IL-1 binding protein (Gruys *et al.* 2005).

b. Réponses induites par les cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires sont responsables de nombreuses réponses locales et systémiques à l'inflammation : activation du système neuro-endocrinien et réduction de la sécrétion des hormones de croissance. Elles induisent également des modifications physiques telles que l'apparition de fièvre, d'anorexie ou encore de catabolisme musculaire. De nombreuses modifications au niveau sanguin peuvent également être décrites comme l'activation du complément ou du système de coagulation, une diminution des taux sériques de calcium, zinc, fer, vitamine A et α -tocophérol, des perturbations des taux de protéines plasmatiques dues à la modification du métabolisme hépatique (Gruys *et al.* 2005).

Les cytokines induisent également l'expression des récepteurs aux protéines du complément et des sélectines à la surface des cellules endothéliales permettant le recrutement des cellules de l'inflammation depuis la circulation sanguine. Elles activent les cellules inflammatoires ainsi recrutées et développent leur activité de défense (expression des récepteurs au complément, déclenchement de la flambée respiratoire). De plus, elles stimulent l'expression d'autres cytokines comme les chémokines, qui recruteront à leur tour les cellules de l'inflammation (Ceciliani *et al.* 2002; Gruys *et al.* 2005) (**Figure 1**).

c. Activation des voies de signalisation

Les trois principales cytokines pro-inflammatoires synthétisées sont le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. Lors de l'induction de la réponse inflammatoire, l'IL-6 joue un rôle central et son expression est finement régulée. Le TNF- α est produit en premier suivi de l'IL-1 β puis de l'IL-6. TNF- α et IL-1 β stimulent la production de l'IL-6 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur leurs expressions. De plus, l'IL-6 stimule sa propre production ainsi que celle des glucocorticoïdes qui exerceront également un rétrocontrôle négatif sur ces trois

cytokines (Papanicolaou *et al.* 1998) (**Figure 2**). La liaison de ces cytokines à leurs récepteurs à la surface des hépatocytes induit la transmission du signal inflammatoire via la phosphorylation de facteurs de transcription tels que NF-IL6 (Nuclear Factor-IL6) ou l'inhibiteur IκB auquel est associé NF-κB. Ceci permet la translocation de ces facteurs de transcription dans le noyau, suivie de la transcription des gènes des protéines de la phase aiguë également nommées APP (Acute Phase Proteins) (Moshage 1997; Joyce *et al.* 2001; Ceciliani *et al.* 2002) (**Figure 3**).

d. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation

Lors de la phase aiguë de l'inflammation, une rapide augmentation ou diminution de la concentration de certaines protéines plasmatiques est observée. Il s'agit des protéines de la phase aiguë (APP) qui jouent un rôle important dans la restauration de l'homéostasie après une infection. Les APP sont définies comme celles dont la concentration augmente (positive acute phase protein) ou diminue (negative acute phase protein) dans le plasma d'au moins 25% au cours de l'inflammation (Morley *et al.* 1982). La première protéine de la phase aiguë, la protéine C-réactive (C-Reactive Protein : CRP), a été décrite en 1930 chez des patients infectés par un pneumocoque (Tillett *et al.* 1930) et sa concentration peut être multipliée par 1000 au cours de certaines pathologies. La synthèse des APP se fait quasi-exclusivement dans le foie. La plupart circulent dans le sang sous forme glycosylée.

Les protéines de la phase aiguë jouent différentes fonctions : hémostatiques comme le fibrinogène, antimicrobiennes et phagocytiques comme la CRP ou le complément, antithrombotiques (α 1-acide-glycoprotéine : α 1-AGT) ou encore antiprotéolytiques (α 2-macroglobuline : α 2-MG, α 1-antitrypsine, α 1-antichymotrypsine). Parmi ces protéines, on distingue deux groupes : les APP de type I telles que la sérum amyloïde A (SAA), la CRP, le complément C3 ou l'haptoglobine, dont les expressions sont induites par les cytokines de type IL-1 like (IL-1 α/β , TNF- α , TNF- β) et les APP de type II : fibrinogène, haptoglobine et α 2-macroglobuline dont l'expression est régulée par les cytokines IL-6 like (IL-6, IL-11) (Moshage 1997).

3. La migration leucocytaire

Lors de la phase aiguë, la production de médiateurs vasoactifs induit une augmentation du flux vasculaire. La vasodilatation des vaisseaux au niveau local favorise l'extravasation des protéines plasmatiques dans le tissu. En parallèle, la production de cytokines sur le lieu de l'agression favorise la circulation des leucocytes du sang vers le tissu (Moser *et al.* 2004). Les neutrophiles polymorphonucléaires (PNN) sont les premières cellules à gagner le site de l'infection (Segal 2005). Ce sont des cellules phagocytaires majoritaires qui représentent 60 à 70% des leucocytes et constituent le type cellulaire principalement impliqué dans la réaction inflammatoire innée. S'en suit une activation des phagocytes mononucléaires et des lymphocytes. Lorsque l'inflammation devient chronique, de nombreux lymphocytes T porteurs du CD4 ainsi que des phagocytes mononucléaires sont recrutés (Roitt *et al.* 2002).

Les leucocytes sont recrutés au cours de l'agression par la synthèse de molécules d'adhérence et d'agents chimiotactiques. Parmi les cellules impliquées dans la synthèse de ces facteurs, les phagocytes mononucléaires libèrent les cytokines inflammatoires TNF- α ou IL-1 qui induisent l'expression de l'E-sélectine à la surface des cellules endothéliales ainsi que de la P-sélectine conservée dans le corps de Weibel-Palade de l'endothélium et qui pourra être libérée à la surface des cellules lorsque l'endothélium est activé ou endommagé. Ces deux protéines exprimées à la surface des cellules endothéliales favorisent le phénomène de margination en permettant l'interaction avec les PNN circulants et le ralentissement de ceux-ci via leurs glycoprotéines de surface (Roitt *et al.* 2002; Rahman *et al.* 2008).

Le TNF- α et l'IFN- γ induisent également l'expression de molécules d'adhérence endothéliale ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) qui interagissent respectivement avec les intégrines $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_4\beta_1$ situées sur les membranes de neutrophiles et dont l'expression est stimulée par l'activation des cellules. Les neutrophiles migrent ensuite au travers de la paroi endothéliale et interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine) (Kubes 2002; Roitt *et al.* 2002; Neuman 2007) (**Figure 4**). Les neutrophiles agissent en reconnaissant les microorganismes de manière non spécifique, les ingèrent, les détruisent et meurent ; ce sont des cellules à durée de vie courte (Roitt *et al.* 2002). Elles possèdent un riche arsenal en protéines antibiotiques concentrées dans trois types de granules. Les

granules (azurophiles) primaires contiennent les protéinases (cathepsine G, élastase et protéinase 3), la myéloperoxydase (MPO) ainsi que le lysozyme. Les granules secondaires participent à la reconstruction de composants membranaires et contiennent des molécules permettant de limiter les réactions avec les radicaux libres (lactoferrine, transcobalamine II) et du lysozyme. Les lysosomes contiennent les hydrolases acides (Rahman *et al.* 2006). Les organismes ingérés sont contenus dans des vacuoles appelées phagosomes qui fusionnent avec les granules pour former les phagolysosomes dans lesquels ils sont détruits (Roitt *et al.* 2002).

B. Le phénomène du stress oxydant : généralités

1. Définition

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production d'ATP. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs) et de l'azote (ERAs) en équilibre avec les systèmes antioxydants. Le stress oxydant, défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination par les antioxydants, joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose (Uno *et al.* 2010), le diabète de type 2 (Pitocco *et al.* 2010), les pathologies neurodégénératives (Darvesh *et al.* 2010), les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Roessner *et al.* 2008) ou encore la dégénérescence maculaire (Khandhadia *et al.* 2010). Il a également été montré que le stress oxydant jouait un rôle central dans l'initiation, la progression et la malignité de nombreux cancers (Grek *et al.* 2010). Afin de maintenir l'homéostasie redox de la cellule, il existe de nombreux systèmes de défense antioxydante endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non (Rezaie *et al.* 2007).

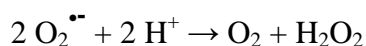
2. Les espèces réactives de l'oxygène

« Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. » (Gardès-Albert *et al.* 2005)

a. Le radical superoxyde, $O_2^{\bullet -}$

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire. Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (Gardès-Albert *et al.* 2005). Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu *et al.* 2010).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger vient de sa réaction de neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants.

L'anion superoxyde est produit de manière physiologique dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie consommatrice d'oxygène et productrice d'énergie pour la cellule. La mitochondrie est ainsi la source principale d'anion superoxyde dans les cellules en condition physiologique (Lambert *et al.* 2009). Les peroxysomes ainsi que le cytochrome p450 constituent également des sources endogènes d' $O_2^{\bullet -}$. Il existe également des sources exogènes d'anion superoxyde comme la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (Ames *et al.* 1993).

Au cours de l'inflammation intestinale, il est généré en grande quantité par les neutrophiles et les macrophages qui colonisent la muqueuse. Ces cellules en contact avec les agents inflammatoires développent une flambée respiratoire riche en anion superoxyde destiné à la destruction des bactéries ou des cellules infectées par les virus (Ames *et al.* 1993). Ce processus implique l'activation de la NADPH oxydase membranaire induisant le relargage de grandes quantités d'EROs. Bien que l'anion superoxyde ne soit pas l'ERO la plus effective dans la lutte contre les infections, sa production continue au cours de processus inflammatoires peut induire des atteintes tissulaires (Kruidenier *et al.* 2002).

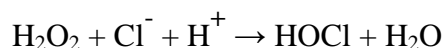
b. Le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne puisse être considéré comme un radical au sens propre, cette molécule dérivée de l'oxygène joue un rôle central dans le phénomène du stress oxydant. Tout système produisant le radical superoxyde générera par voie de conséquence du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, les cellules phagocytaires produisent et relarguent de grandes quantités d'H₂O₂ au cours de l'inflammation. Bien qu'il induise des atteintes aspécifiques et irréversibles des cellules épithéliales (Mulier *et al.* 1998), le peroxyde d'hydrogène est généralement considéré comme une ERO relativement faible mais hautement réactive, en particulier dans sa capacité à réagir avec les ions partiellement réduits Fe²⁺ et Cu⁺ formant le radical hydroxyl dans la réaction de Fenton (Wardman *et al.* 1996) :



c. L'acide hypochloreux, HOCl

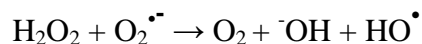
Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme MPO est élevée et l'acide hypochloreux est un agent chlorant et oxydant fort.



L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène et a des cibles bien marquées : inactivation enzymatique, oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire.

d. Le radical hydroxyle, HO[•]

Comme indiqué précédemment, le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss :

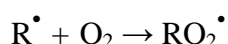


HO[•] est considéré comme l'ERO la plus réactive (Lubec 1996), inactivant la pyruvate-déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastro-intestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives à l'ADN.

Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux (Fe²⁺) ou le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote (Kruidenier *et al.* 2002).

e. Les radicaux peroxydes

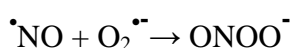
Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (R[•]). Les radicaux R[•] sont issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).



Plusieurs modes d'actions sont décrits pour les propriétés oxydantes des radicaux peroxydes : transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène (arrachement d'un atome H), addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires) et formation d'endoperoxydes radicalaires ROOR[•]. Les radicaux RO₂[•] peuvent également se décomposer avant d'avoir réagi avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes (Gardès-Albert *et al.* 2005).

3. Les espèces réactives de l'azote

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote ; il s'agit du monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) et du peroxynitrite (ONOO^-). Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les « nitric oxide synthases » (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L'isoforme inducible iNOS de l'enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, produisant ainsi de grandes quantités de monoxyde d'azote comparativement aux faibles quantités générées par l'isoforme endothéliale eNOS (Rao 2004). Le monoxyde d'azote lui-même se caractérise par une diffusivité élevée, une réactivité limitée et une demi-vie qui n'excède pas quelques secondes, il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires (Blanc *et al.* 2005). Cependant le $\cdot\text{NO}$ peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxynitrite beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Murphy *et al.* 1998).



Le peroxynitrite a une demi-vie plus longue et traverse facilement les membranes lipidiques. Il oxyde les lipides composant les membranes mitochondriales, altère les canaux sodiques et favorise la perméabilité vasculaire et la formation d'œdème (Kruidenier *et al.* 2002).

4. Les cibles des EROs et des ERAs

Les EROs et ERAs induisent des atteintes oxydatives sur des composés cellulaires et extra-cellulaires en général proches de leur site de production du fait de leur demi-vie relativement courte.

a. Oxydation des composés lipidiques

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme

un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydroperoxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonénal (Kruidenier *et al.* 2002; Thérond *et al.* 2005a; Valko *et al.* 2006).

Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydroperoxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires (Esterbauer *et al.* 1992; Kruidenier *et al.* 2002; Valko *et al.* 2006).

b. Oxydation des composés protéiques

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par voie de conséquence des cibles importantes du stress oxydant. La modification structurale mineure d'une protéine peut induire une forte variabilité dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif pour induire des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels comme des fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations des fonctions des protéines. L'oxydation induit également des modifications de conformation ainsi que des phénomènes de fragmentation. L'oxydation des protéines peut également induire des réticulations inter- et intra-protéines par addition d'un groupement lysine sur le groupement carbonyle d'une protéine oxydée, par oxydation d'un groupement sulfhydryle des résidus cystéine formant ainsi des ponts disulfures ou par oxydation des résidus tyrosine formant des ponts Tyr-Tyr. De plus, la nitration des protéines par liaison du peroxy-nitrite sur les fonctions tyrosine peut induire de sévères modifications de fonction. En effet, la tyrosine est un acide aminé particulièrement impliqué dans les voies de signalisation, en particulier par les réactions de phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Kruidenier *et al.* 2002; Valko *et al.* 2006).

c. Oxydation de l'ADN

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles des EROs. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko *et al.* 2006). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko *et al.* 2006). Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OH-G). Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dosé dans les urines et est considéré comme un marqueur de carcinogenèse (Valko *et al.* 2006). Les ERAs peuvent également induire des oxydations de l'ADN et le monoxyde d'azote ou le peroxy-nitrite peuvent oxyder la chromatine. De plus, le peroxy-nitrite peut induire la formation de 8-nitroguanine (Kruidenier *et al.* 2002; Valko *et al.* 2006). Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions Fe^{2+} et Cu^+ associés à la chromatine produisant ainsi *in situ* le radical hydroxyle qui attaque l'ADN proche (Kruidenier *et al.* 2002).

5. Les systèmes de défense antioxydants

La production excessive ou incontrôlée d'espèces oxydantes induit une perturbation du statut redox pouvant induire de sérieuses altérations des structures cellulaires. Il est donc absolument nécessaire que cette production d'EROs et d'ERAs soit contrôlée. Pour cela, les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydantes classées en antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques. Les composés antioxydants sont définis comme « toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell 1990). Parmi ces composés, les systèmes de défense enzymatiques sont reconnus comme étant les plus performants.

a. Les antioxydants non-enzymatiques

Parmi les antioxydants non-enzymatiques, on distingue des composés endogènes et des composés exogènes. Ces derniers (vitamines C et E, polyphénols...) sont principalement apportés à l'organisme par l'alimentation. Les polyphénols, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les extraits végétaux seront présentés dans le second chapitre du présent manuscrit.

Les antioxydants non-enzymatiques endogènes sont présents dans les cellules. La plupart sont des agents hydrosolubles tels que le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et l'ubiquinol (coenzyme Q réduit).

a.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Avec son groupement sulfhydryle, il est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire (concentration de 10^{-4} à 10^{-3} M) et est essentiellement présent sous forme réduite (la concentration de la forme oxydée dissulfure GSSG est au moins 10 fois plus faible). Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases (GPx), mais également par ses propriétés intrinsèques. En effet, le glutathion prévient l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il peut également chélater les ions cuivreux Cu^+ et limiter ainsi leur participation à la réaction de Fenton. Il est directement impliqué dans la réparation des atteintes oxydatives à l'ADN. La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée se fait grâce à l'activité de la glutathion réductase (GR) (Kruidenier *et al.* 2002; Thérond *et al.* 2005b) (**Figure 5**).

a.2. Les vitamines

Le terme de vitamine E désigne une famille composée des tocophérols et des tocotriénols. La forme la plus active, l' α -tocophérol, est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes. Situé dans les lipoprotéines et les membranes, il est capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical hydroxyle et former le radical tocophéryle. Les besoins en vitamine E de l'adulte sont de 12 mg/j et les sources principales sont les huiles végétales, les germes de blé, les noix et certains légumes à feuilles vertes. L' α -tocophérol peut être régénéré lors de la réduction du radical tocophéryle par la vitamine C ou acide ascorbique (Brigelius-Flohe *et al.* 1999). Ce dernier est le plus

fréquemment présent sous forme d'ascorbate et est considéré comme l'antioxydant le plus important des fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des EROs. Il réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyle ce qui protège les lipoprotéines et les membranes de la peroxydation lipidique. Les besoins en vitamine C chez l'adulte sont de 110 mg/j et les principales sources sont les agrumes et les légumes (Roussel *et al.* 2005) (**Figure 6**).

a.3. Autres antioxydants non-enzymatiques

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résultant du catabolisme de l'hémoglobine. Il s'agit d'un composé non hydrosoluble à pH physiologique qui se lie à l'albumine empêchant ainsi sa pénétration dans les tissus riches en lipides comme le cerveau. La bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes RO_2^\bullet et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Thérond *et al.* 2005b) (**Figure 7**).

L'acide urique est produit par oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. Au pH physiologique, il est majoritairement présent sous la forme ionisée (urate) pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire UrH^\bullet stable. Celle-ci est à son tour réduite par l'ascorbate régénérant l'urate. L'urate protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxy-nitrite. Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique (Simic *et al.* 1989; Whiteman *et al.* 2002) (**Figure 7**).

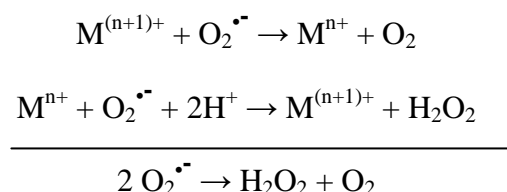
Le coenzyme Q est un composé hydrophobe qui joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Il est également présent dans d'autres membranes cellulaires et dans les lipoprotéines où il joue un rôle d'antioxydant. L'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q) contenu dans les LDL (low density lipoprotein) joue un rôle important dans leur résistance à l'oxydation. Cependant son rôle en tant qu'antioxydant peut être discuté dans la mesure où le coenzyme Q peut être à l'origine de la production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Beyer 1994; Thérond *et al.* 2005b) (**Figure 7**).

b. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaires contre les attaques oxydatives. Ces enzymes sont hautement conservées et présentes chez l'ensemble des mammifères.

b.1. Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène 10000 fois plus rapidement que la dismutation spontanée de l'anion superoxyde (Halliwell *et al.* 1999). Ces enzymes sont largement distribuées dans l'ensemble des organismes vivants. Selon le cofacteur métallique présent dans le centre actif et le nombre de sous-unités constituant l'enzyme, on distingue quatre isoformes : la SOD à cuivre et à zinc (SOD1), la SOD à manganèse (SOD2), la SOD à cuivre et à zinc extracellulaire (SOD3) et la SOD à nickel récemment décrite (Thérond *et al.* 2005b; Valko *et al.* 2006; Abreu *et al.* 2010). Le mécanisme catalytique des SOD a été appelé mécanisme en « ping-pong » impliquant une étape de réduction suivie d'une oxydation de l'atome métallique (M) concomitantes à l'oxydation puis à la réduction de radicaux superoxydes (Abreu *et al.* 2010) :

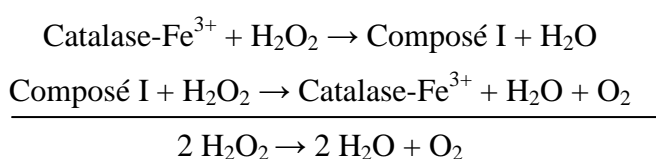


La SOD à cuivre et à zinc (SOD1) est un homodimère de 32 kDa. Chaque sous-unité contient un atome de cuivre et de zinc. Les ions cuivre (Cu^{2+}) sont nécessaires à son activité catalytique alors que les ions zinc (Zn^{2+}) stabilisent la molécule. Elle est principalement localisée dans le cytoplasme, dans une moindre mesure dans le noyau et absente des mitochondries. Il s'agit de l'isoforme la plus abondante, représentant environ 70% de l'activité SOD totale. En plus de l'anion superoxyde, la SOD1 accepte le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite comme substrats générant respectivement des radicaux hydroxyles et des ions nitronium (Kruidenier *et al.* 2002; Thérond *et al.* 2005b; Valko *et al.* 2006). La SOD à manganèse (SOD2) est un homotétramère de 96 kDa contenant un atome de manganèse par sous-unité. Cette isoforme est exclusivement située dans la mitochondrie

et représente environ 15% de l'activité SOD totale. La SOD extracellulaire (SOD3) est la forme dominante dans le plasma et l'espace extracellulaire. Il s'agit d'une glycoprotéine tétramérique de 135 kDa contenant des atomes de cuivre et de zinc avec une forte affinité pour les glycosaminoglycanes tels que l'héparine. Son activité est estimée comme allant de 0,5 à 17% de l'activité SOD totale (Kruidenier *et al.* 2002; Valko *et al.* 2006). La SOD à nickel, dernière isoforme décrite, présente une structure hexamérique de 80 kDa dont chaque monomère contient un atome de nickel (Abreu *et al.* 2010). Elle a été découverte chez des *Streptomyces* et dans les cyanobactéries et ne présente pas d'homologie de séquences avec les autres enzymes de la famille (Valko *et al.* 2006).

b.2. La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et les érythrocytes (Valko *et al.* 2006). D'un poids moléculaire de 220 kDa, elle est formée de quatre sous-unités, chacune comportant un groupement ferriprotoporphyrine avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} . La réaction se déroule en deux étapes : dans un premier temps, une molécule de peroxyde d'hydrogène oxyde l'atome de fer de l'enzyme et forme un groupement oxyferryle avec un radical porphyrine nommé composé I ; dans un second temps le composé I oxyde une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène. L'enzyme peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations supérieures à 100 μM (Thérond *et al.* 2005b; Kirkman *et al.* 2007).

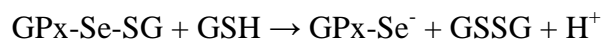
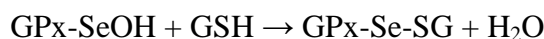
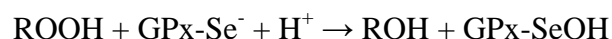


Son activité est la plus importante dans les globules rouges, les hépatocytes et les reins (Thérond *et al.* 2005b).

b.3. Les glutathion peroxydases

Les GPx jouent le même rôle catalytique que la catalase, à savoir la détoxification du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques en couplant leur réduction à l'oxydation d'un substrat réducteur, le glutathion. Les différentes isoenzymes (5 isoformes, GPx1-4 et GPx6) contiennent dans leurs sous-unités (une ou quatre selon l'isoforme) un atome de

sélénium sous forme de sélénocystéine. Elles fonctionnent toutes selon un même schéma catalytique :



La GPx présente une meilleure affinité pour le peroxyde d'hydrogène que la CAT mais n'en est pas spécifique et peut réagir avec des hydroperoxydes d'esters de cholestérol ou de phospholipides membranaires, de lipoprotéines ou d'ADN. Par contre, la GPx est spécifique de son cofacteur, le glutathion (Thérond *et al.* 2005b; Valko *et al.* 2006; Brigelius-Flohe *et al.* 2009).

La GPx1 est localisée dans le cytoplasme à 90% et les mitochondries à 10%. Elle est l'isoforme la plus abondante et est exprimée dans la plupart des cellules. Sa structure est tétramérique avec une masse moléculaire de 85 à 95 kDa et elle possède une sélénocystéine dans son site actif (Thérond *et al.* 2005b; Brigelius-Flohe *et al.* 2009).

La GPx2 a structure tétramérique de 80 kDa. Elle est située dans le cytoplasme des cellules du tractus gastro-intestinal et est également détectable dans le foie. Elle joue un rôle particulier pour réduire spécifiquement les hydroperoxydes d'origine alimentaire et ceux produits au cours de la peroxydation lipidique intestinale (Thérond *et al.* 2005b; Brigelius-Flohe *et al.* 2009).

La GPx3 est une glycoprotéine tétramérique dont chaque sous-unité de 22 kDa contient une sélénocystéine. Elle est présente dans le plasma mais également dans les reins, les poumons, le cœur et le placenta. Cette isoforme peut réagir avec un autre cofacteur que le GSH, la thiorédoxine (Thérond *et al.* 2005b).

La GPx4 ou PH-GPx (Phospholipid hydroperoxyde glutathione peroxidase) est une protéine monomérique possédant une sélénocystéine dans le site actif. Sa masse moléculaire est de 22-23 kDa dans les cellules animales et de 18 kDa dans les cellules humaines. Elle se situe dans la mitochondrie et dans le cytoplasme. Elle joue un rôle primordial dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (Thérond *et al.* 2005b; Brigelius-Flohe *et al.* 2009).

L'expression de la GPx6 serait restreinte au développement embryonnaire ainsi qu'à l'épithélium olfactif chez l'adulte (Kryukov *et al.* 2003). Cependant, peu de données sont actuellement disponibles quant à la caractérisation de sa fonction, de sa distribution dans les autres tissus ou de son éventuelle implication pathologique (Reeves *et al.* 2009).

La régénération du GSH réduit à partir du GSSG se fait par l'action de la GR, une enzyme à flavine qui fonctionne par oxydation du NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Thérond *et al.* 2005b).



C. L'inflammation intestinale

1. L'appareil digestif

a. Organisation générale du tube digestif

Le tube digestif est un tube creux ouvert aux deux extrémités et dont la lumière est en contact direct avec l'environnement extérieur. Le tube digestif comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le côlon (ascendant, transverse et sigmoïde), le rectum et l'anus (**Figure 8**). La structure du tube digestif varie sur toute sa longueur selon les fonctions particulières de chaque région. Cependant, il existe de nombreux points communs dans l'organisation générale des tissus. La paroi de l'intestin est composée de plusieurs tuniques circulaires. De l'extérieur vers la lumière intestinale, on distingue la séreuse, la musculuse externe, la sous-muqueuse, la musculaire muqueuse et la muqueuse en contact direct avec le contenu intestinal (Pocock *et al.* 2004) (**Figure 9**).

b. Histologie des structures

La séreuse recouvre le tube digestif. Elle forme le péritoine viscéral et est en continuité avec le péritoine pariétal. Elle est constituée de tissu conjonctif lâche recouvert d'un épithélium simple squameux. La musculuse externe est constituée d'une couche longitudinale et d'une couche circulaire de fibres musculaires lisses permettant la contraction de l'organe et ainsi le mélange et la migration des aliments le long du tube digestif. Cette couche musculaire est épaissie dans le côlon. La sous-muqueuse est

constituée d'un tissu conjonctif lâche et contient du collagène, des fibrilles d'élastine, des vaisseaux de gros calibre, des vaisseaux lymphatiques et dans certains endroits des glandes sous-muqueuses (Pocock *et al.* 2004).

La partie la plus interne de l'intestin est la muqueuse. Dans le côlon, cette structure est dépourvue de villosités, mais l'augmentation de surface nécessaire aux fonctions de résorption et de sécrétion est réalisée par la multitude de cryptes profondes serrées les unes contre les autres. L'épithélium est constitué d'entérocytes à bordure en brosse et est très riche en cellules caliciformes sécrétrices du mucus de lubrification. Sous la muqueuse, le chorion ou *lamina propria*, est un tissu conjonctif richement vascularisé. Directement sous le fond des cryptes se trouve la muqueuse musculaire constituée d'une fine couche de fibres musculaires lisses longitudinales (Kühnel 1998) (**Figure 10**).

2. L'immunité intestinale

a. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

Le tube digestif représente une immense surface de contact direct avec les aliments, les bactéries de la flore commensale, mais également avec certains pathogènes invasifs issus du milieu extérieur. Ainsi, l'intestin doit avoir une capacité de surveillance immunitaire. La barrière intestinale limitant l'accès des substances nuisibles à l'organisme est composée de plusieurs éléments : les enzymes pancréatiques, l'épithélium intestinal, les bactéries de la flore commensale et le tissu lymphoïde secondaire. Les structures lymphoïdes secondaires comprennent des organes structurés comme la rate ou les ganglions lymphatiques et les accumulations lymphoïdes non encapsulées. Le tissu lymphoïde que l'on trouve associé aux muqueuses est appelé MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue). Ces tissus sont associés aux muqueuses où s'effectue la première rencontre avec les antigènes entrants. Ainsi, le tissu lymphoïde associé au tractus digestif est le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) (Roitt *et al.* 2002; Ahern *et al.* 2008; Koboziev *et al.* 2010).

b. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale : le GALT

Le GALT est divisé en deux compartiments : le GALT organisé et le GALT diffus (**Figure 11**).

b.1. Le GALT organisé

Le GALT organisé est le site d'induction de la réponse immunitaire intestinale. Il est formé des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques où se font la maturation et l'activation des cellules effectrices de la réponse.

Les plaques de Peyer sont des agrégats lymphoïdes macroscopiques situés dans la muqueuse de l'intestin grêle. Elles sont séparées de la lumière par une monocouche de cellules (follicle associated epithelium : FAE) formée de cellules épithéliales, de cellules M, de lymphocytes intraépithéliaux et de quelques cellules caliciformes. Les cellules M sont des entérocytes dépourvus de glycocalix et dont la surface luminale présente des replis à la place des microvillosités habituelles. Ces cellules sont spécialisées dans l'absorption des antigènes. Sous le FAE, se trouve une région diffuse, le dôme subépithélial formé de cellules dendritiques et de quelques macrophages, en dessous de laquelle se trouve le centre germinatif comprenant de nombreux follicules constitués de lymphocytes B IgM⁺, précurseurs des cellules plasmiques productrices d'immunoglobuline-A (IgA). Entre les follicules se trouvent les zones interfolliculaires comprenant des lymphocytes T (pour la plupart T helper), des cellules dendritiques matures et des macrophages. Contrairement aux autres structures lymphoïdes, les plaques de Peyer ne sont pas irriguées par les vaisseaux lymphatiques afférents et l'ensemble des cellules gagne ces structures via la circulation sanguine au travers des veinules post-capillaires (high endothelial venules : HEV). Le trafic cellulaire au départ des plaques de Peyer se fait par des vaisseaux lymphatiques efférents. Des follicules lymphoïdes isolés présentant une structure similaire sont répartis dans la paroi du côlon et sont considérés comme assurant le même type de fonction que les plaques de Peyer (Wittig *et al.* 2003; Ramiro-Puig *et al.* 2008).

Les ganglions mésentériques (**Figure 12**) sont situés dans le mésentère intestinal et sont divisés en trois régions de composition cellulaire différente : le cortex, le paracortex et la zone médullaire. Le cortex est constitué de follicules primaires et secondaires riches en lymphocytes B et en cellules dendritiques. Le paracortex contient quant à lui une forte proportion de lymphocytes T et de cellules dendritiques. La zone médullaire est la région la

plus profonde des ganglions, elle se compose de lymphocytes T et B et de plasmocytes (Wittig *et al.* 2003; Ramiro-Puig *et al.* 2008).

b.2. Le GALT diffus

Le GALT diffus est l'effecteur de la réponse immunitaire. Il est formé des populations lymphocytaires dispersées entre les cellules épithéliales : les lymphocytes intraépithéliaux ou lymphocytes de la *lamina propria*. La *lamina propria* contient une population hétérogène de lymphocytes et de cellules myéloïdes : macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles et mastocytes (Wittig *et al.* 2003).

c. La réponse immunitaire intestinale

Lors d'une agression au niveau intestinal, le GALT permet l'induction d'une réponse inflammatoire. Afin que celle-ci se développe, les cellules T naïves doivent gagner les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques où se fait leur activation par la présentation de l'antigène suivie de leur polarisation en cellules effectrices de type Th1, Th2 ou Th17. Ces cellules effectrices quittent ensuite les structures lymphoïdes pour gagner la circulation générale, rejoindre le site d'infection et détruire l'agent pathogène (Ramiro-Puig *et al.* 2008) (**Figure 13**).

c.1. L'intégration de l'antigène

L'antigène peut pénétrer la muqueuse intestinale de différentes façons. La voie principale d'intégration de l'antigène passe par les cellules M de la monocouche cellulaire située en surface des plaques de Peyer. La membrane apicale des cellules M favorise l'adhésion et l'intégration des agents luminaux comme les macromolécules, les molécules d'adhésion, les virus ou les bactéries. Ces cellules peuvent également intégrer certaines protéines alimentaires ou encore les IgA. Les cellules M internalisent l'antigène luminal par endocytose ou phagocytose. Les vésicules migrent alors jusqu'à la membrane baso-latérale de la cellule et relarguent l'agent infectieux dans la matrice extra-cellulaire. La membrane baso-latérale des cellules M possède de nombreuses invaginations contenant des lymphocytes et des macrophages impliqués dans la prise en charge de l'antigène pour sa présentation (Neutra *et al.* 1996).

La seconde voie d'intégration des antigènes implique directement les entérocytes. Cependant, ceux-ci sont moins accessibles que les cellules M du fait de la présence du

glycocallix riche en enzymes hydrolytiques bloquant l'entrée d'agrégats macromoléculaires et de microorganismes. Il semblerait qu'ils soient également capables de présenter l'antigène aux cellules T (Hershberg *et al.* 2000).

L'intégration des antigènes luminaux peut également se faire par un mécanisme paracellulaire, via le passage des dendrites des cellules dendritiques entre les entérocytes (Rescigno *et al.* 2001).

Une fois intégré, l'antigène luminal est transporté jusqu'aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) localisées sous le dôme subépithélial des plaques de Peyer. Les CPA internalisent l'antigène et le convertissent en peptide antigénique exprimé à la surface des cellules associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II afin d'être reconnu par les récepteurs des cellules T (TCR : T cell receptor). Les CPA activées peuvent interagir directement avec les lymphocytes T des plaques de Peyer ou migrer dans les ganglions mésentériques (Ramiro-Puig *et al.* 2008).

c.2. La migration cellulaire et l'activation des lymphocytes T

Les ganglions mésentériques sont le lieu principal de l'activation des lymphocytes T effecteurs. Ainsi, les lymphocytes T naïfs doivent gagner les ganglions mésentériques depuis le sang via les veinules post-capillaires HEVs. Ce phénomène de recrutement et d'activation des lymphocytes T est contrôlé par une séquence de trois étapes moléculaires distinctes : signalisation et adhésion des cellules T à la surface endothéliale, roulement à la surface de l'endothélium puis activation. Les ganglions mésentériques et les HEVs expriment, sous l'influence de cytokines comme le TNF- α , des molécules d'adhérence MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) et PNA_d (peripheral lymph node addressin) avec lesquelles vont se lier les L-sélectines situées à la surface des lymphocytes. Ceci entraîne le roulement et le ralentissement des lymphocytes T à la surface de l'endothélium. Les interactions entre les intégrines des lymphocytes T et les molécules d'adhérence de l'endothélium (ICAM-1 et MAdCAM-1) ainsi que celles entre les chémokines du tissu lymphoïde secondaire et les récepteurs correspondant des cellules T vont permettre une forte adhésion de ces cellules suivie de leur arrêt puis de leur extravasation dans les ganglions mésentériques (Neuman 2007; Koboziev *et al.* 2010).

Une fois les cellules T CD4⁺ dans les ganglions mésentériques, elles se lient au complexe CMH-antigène à la surface des CPA ce qui induit leur activation. Au cours de

cette première activation, les cellules T perdent leur L-sélectine et expriment d'autres molécules d'adhésion spécifiques au retour à l'intestin ($\alpha 4\beta 7$, CCR9, LFA-1, VLA-4 et CD44) (Neuman 2007; Kobozev *et al.* 2010).

c.3. Le retour des lymphocytes T sur le lieu de l'infection

Une fois activées, ces cellules regagnent la circulation systémique via les vaisseaux lymphatiques efférents. Cette migration est à nouveau régulée par les interactions entre $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 avec les molécules MAdCAM-1 et CCL25 des veinules post-capillaires. Lorsque les lymphocytes T activés regagnent l'intestin où a lieu l'infection, une seconde interaction avec le peptide antigénique présent sur une population variée de CPA (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B) résulte en une réponse plus rapide et plus vive des cellules T avec une forte augmentation de la production d'IFN- γ , d'IL-17, de TNF- α , de lymphotoxine- α et d'IL-2. L'IL-2 va favoriser l'expansion clonale des cellules T et stimuler la fonction des cellules T helper et des cellules B. L'IFN- γ active les CPA et les macrophages pour la production d'IL-12. De plus, les macrophages ainsi activés vont augmenter leur production de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 ainsi que d'EROs et d'ERAs. L'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-17 ont une action combinée pour stimuler l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales des veinules post-capillaires afin de favoriser la migration des lymphocytes T effecteurs (**Figure 14**). L'ensemble résulte en une production massive de cellules Th1, Th2 ou Th17 et de médiateurs de l'inflammation dérivés des macrophages ainsi qu'en un recrutement de leucocytes pouvant conduire à l'induction d'une inflammation chronique (Ramiro-Puig *et al.* 2008; Kobozev *et al.* 2010) (**Figure 15**).

c.4. Les immunoglobulines de la muqueuse intestinale

Certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 ou le TGF- β induisent la synthèse d'IgA par les lymphocytes B folliculaires dans les plaques de Peyer. Les immunoglobulines sont des glycoprotéines principalement synthétisées par les lymphocytes B et présentes dans la plupart des sécrétions externes en particulier au niveau des muqueuses. L'IgA principalement synthétisée dans la *lamina propria* est l'immunoglobuline la plus abondante dans la muqueuse intestinale (80-90%) et joue un rôle important dans la première ligne de défense contre les toxines ainsi que lors de la colonisation ou de l'invasion par des pathogènes. L'IgM (immunoglobuline M) est également présente à la surface de l'intestin

mais en plus faible proportion (6-18%) que l'IgA en raison d'un nombre plus faible de cellules productrices ainsi que d'un transport dans la lumière moins efficace. L'IgG (immunoglobuline G) est l'isotype mineur de la muqueuse intestinale. Malgré le fait qu'il n'y ait pas de transporteur actif de l'IgG, une voie paracellulaire lui permet de gagner la lumière intestinale (Roitt *et al.* 2002; Ramiro-Puig *et al.* 2008).

3. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales

a. Généralités

Le terme « maladies inflammatoires chroniques de l'intestin » (MICI) regroupe deux pathologies intestinales idiopathiques : la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Les MICI sont des atteintes chroniques récidivantes associées à une inflammation incontrôlée du tractus gastro-intestinal (Hanauer 2006). Le nombre de personnes atteintes de MICI est estimé à 1 million pour l'Amérique du Nord seule (Bamias *et al.* 2005) et il a été montré que ces pathologies prédisposaient, à terme, au développement de cancers colorectaux (Itzkowitz *et al.* 2004). RCH et MC sont deux formes d'inflammation intestinale avec des causes et des mécanismes pathogéniques différents mais dans les deux cas il s'agit d'une réponse immunitaire inappropriée chez des individus ayant une prédisposition génétique, résultant d'une interaction complexe entre facteurs environnementaux, facteurs microbiens et système immunitaire intestinal (Danese *et al.* 2006) (**Figure 16**).

b. Facteurs environnementaux

Au cours du siècle dernier, les pathologies affectant l'être humain ont considérablement changé et les principales affections sont passées d'infectieuses à chroniques ou néoplasiques. Cette modification s'est tout d'abord produite dans les pays occidentaux mais ce phénomène est actuellement observé dans d'autres parties du monde comme l'Asie ou l'Amérique du Sud (Cohen 2000).

L'émergence de pathologies chroniques auto-immunes ou inflammatoires comme les MICI est considérée comme étant en partie liée aux évolutions socio-économiques. Les MICI ont été tout d'abord observées en Europe et en Amérique du Nord, puis sont apparues après la seconde guerre mondiale en Europe centrale, au Japon et en Amérique du Sud. Une première hypothèse « hygiéniste » a alors été mise en avant considérant que les

modifications fondamentales des modes de vie ont fait passer les populations d'une exposition microbienne forte à faible et qu'une faible acquisition d'antigènes microbiens dans les premières années de la vie pouvait conduire à un système immunitaire moins adapté pour répondre aux agressions, ce qui se traduirait par des pathologies immunes chroniques (Bach 2002). A ceci s'ajoutent d'autres modifications environnementales : l'amélioration de l'habitat, des aliments plus sains, une modification des comportements sanitaires, la généralisation des vaccins ou de l'utilisation des antibiotiques, la diminution des parasites ainsi que des régimes alimentaires de meilleure qualité mais cependant moins variés. D'autres facteurs pourraient entrer en jeu comme le tabagisme, certaines habitudes alimentaires, la consommation de drogues, le statut social ou le stress (Danese *et al.* 2006). Cependant, les facteurs environnementaux seuls ne peuvent expliquer le développement d'une MC ou d'une RCH et une prédisposition individuelle est nécessaire au développement de ces pathologies.

c. Facteurs microbiens

Les éléments concluant à une responsabilité microbiologique dans ces pathologies restent relativement faibles. Cependant certaines données permettent de proposer quelques souches bactériennes comme pouvant jouer un rôle dans les MICI. C'est le cas de *Listeria monocytogenes*, d'*Escherichia coli* ou encore de *Mycobacterium paratuberculosis* (Danese *et al.* 2006). En effet, *M. paratuberculosis* est responsable de la maladie de Johne, une entérite touchant les ovins et les bovins semblable à la MC et cette souche bactérienne a été isolée dans certains tissus prélevés chez des patients atteints de MC (Chiodini *et al.* 1984). Cependant, les traitements antituberculeux se sont montrés sans effet chez ces patients (Thomas *et al.* 1998). De plus, il a été montré qu'une souche adhérente invasive d'*E. coli* était également associée à la MC (Darfeuille-Michaud *et al.* 1998). Par ailleurs, même si l'origine microbienne des MICI n'est pas certaine, le lien avec la flore commensale, cible de la réponse immunitaire, est bien établi (Macdonald *et al.* 2005). Les lésions intestinales observées lors de ces pathologies se situent préférentiellement dans les segments du tractus gastro-intestinal où les concentrations bactériennes sont les plus élevées, c'est-à-dire la valve iléo-cæcale et le côlon (D'Haens *et al.* 1998). La plupart des patients atteints de MICI affichent une réactivité immunologique locale et systémique particulièrement élevée face aux antigènes bactériens. Ceci s'expliquerait par une perte de la tolérance à la flore entérale autologue, résultant en une réponse immunitaire inappropriée de la muqueuse intestinale se

manifestant par une inflammation chronique typique des MICI (Duchmann *et al.* 1995). Par ailleurs, il a été montré que la MC est génétiquement associée à des mutations du gène NOD2/CARD15 qui code pour une protéine cytoplasmique de reconnaissance des bactéries. Il semblerait que ces mutations constituent une partie du lien entre flore intestinale et réponse immunitaire altérée (Girardin *et al.* 2003).

d. Facteurs cellulaires

Dans les conditions physiologiques, il existe une inflammation basale dans la muqueuse intestinale due à la présence de nombreux leucocytes dans les tissus intestinaux intra-épithéliaux et subépithéliaux. Ces leucocytes induisent une inflammation contrôlée faisant face à une très large variété d'antigènes alimentaires et bactériens permettant ainsi le maintien de l'homéostasie intestinale (Neuman 2007).

Lors des MICI, une réponse immunitaire inappropriée et persistante conduit à des anomalies anatomiques et fonctionnelles. Des cellules immunitaires telles que les PNN, les macrophages et les cellules T sont activées et libèrent de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que des métabolites de l'oxygène et de l'azote, des protéines cytotoxiques, des enzymes lytiques et des cytokines conduisant à la destruction des entérocytes et à une inflammation pathologique du tissu intestinal (Neuman 2007). De plus, la réponse immunitaire innée joue un rôle central. Les cellules dendritiques et les macrophages sécrètent également des cytokines qui régulent la réaction inflammatoire en déclenchant une réponse immunitaire adaptative via l'activation des cellules T. Le dysfonctionnement de cette régulation induit un déséquilibre entre les cellules T régulatrices (Th1, Th2 et Th17) et conduit à la surproduction des molécules effectrices de ces cellules participant ainsi au développement et à l'exacerbation de la pathologie (Papadakis *et al.* 2000; Sanchez-Munoz *et al.* 2008).

Des cellules non-immunitaires sont également impliquées dans les MICI. Dans les muqueuses enflammées de patients atteints de MICI, les cellules épithéliales intestinales présentent une expression inappropriée des antigènes HLA-DR (human leucocyte antigen-DR) du CMH de classe II (Selby *et al.* 1983) en faveur de l'activation des cellules T CD4+ ce qui potentiellement amplifie l'inflammation (Mayer *et al.* 1990). Les fibroblastes des tissus de soutien participent également à la pathologie. En effet, ces cellules sont une source

majeure de métalloprotéinases matricielles (MMPs), enzymes protéolytiques impliquées dans la destruction tissulaire lors de l'inflammation (von Lampe *et al.* 2000).

4. Marqueurs de l'inflammation intestinale

a. La myéloperoxydase

La MPO est une des protéines les plus abondantes dans les cellules phagocytaires. Elle représente 5% des protéines des neutrophiles et 1% de celles des monocytes. Ces différentes cellules colonisent en grand nombre les tissus lors des phénomènes inflammatoires et les neutrophiles activés libèrent cette enzyme dans la muqueuse intestinale. Le dosage de l'activité de la MPO dans la muqueuse intestinale est ainsi utilisé comme marqueur de l'état inflammatoire. La MPO est une peroxydase hémique présente principalement dans les granules primaires des PNN et à plus faible concentration dans les monocytes et les macrophages. L'enzyme est un homodimère dont chaque hémi-enzyme est formée de deux sous-unités (une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de 59 à 64 kDa) reliées par un pont dissulfure. La MPO catalyse l'oxydation de l'ion chlorure par le peroxyde d'hydrogène pour former l'acide hypochloreux (HOCl). Son activité est directement proportionnelle au nombre de neutrophiles présents dans la muqueuse colique et une concentration anormalement élevée en MPO est le signe d'une activation importante ou excessive des PNN. Ainsi la mesure de l'activité de cette enzyme est couramment utilisée comme marqueur de l'inflammation intestinale (Krawisz *et al.* 1984; SerTEYN *et al.* 2003).

b. Les cytokines

Les cytokines les plus couramment recherchées lors de l'inflammation (TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-4, IL-5 et IL-10) assurent la communication entre les différentes cellules immunitaires. Par ailleurs, elles régulent la production de nombreux autres médiateurs de l'inflammation : les EROs, le monoxyde d'azote et les prostaglandines. Elles activent des voies de signalisation telles que NF- κ B et inhibent l'apoptose (Sanchez-Munoz *et al.* 2008). Au cours de l'inflammation intestinale, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) est augmentée.

Le TNF- α est produit par les lymphocytes et les CPA, il exerce ses effets pro-inflammatoires en induisant la production d'IL-1 β et d'IL-6 ainsi qu'en favorisant l'expression de molécules d'adhérence nécessaires à la prolifération cellulaire, en

déclenchant la production des protéines de la phase aiguë et en inhibant l'apoptose (Sanchez-Munoz *et al.* 2008). L'implication du TNF- α dans l'inflammation intestinale a été montrée chez l'homme et des anticorps anti-TNF sont utilisés dans les traitements de MICI (Kaser *et al.* 2010). Cette augmentation du TNF- α est également mesurée comme marqueur de l'inflammation dans les modèles expérimentaux d'inflammation intestinale (Neurath *et al.* 1997; Gratz *et al.* 2002; Okayama *et al.* 2007).

L'IL-1 joue également un rôle important dans l'inflammation par son activité de stimulation immunologique et son activité pro-inflammatoire (Neuman 2007; Sanchez-Munoz *et al.* 2008). L'IL-1 regroupe l'IL-1 α et l'IL-1 β . Toutes deux sont impliquées dans l'induction de la cyclooxygénase 2, de la phospholipase A2 et de l'iNOS (Dinarello 2002). L'augmentation de l'IL-1 dans la muqueuse intestinale est décrite depuis longtemps chez des patients atteints de MICI (Mahida *et al.* 1989). Elle est également retrouvée dans les modèles animaux d'inflammation intestinale (Rojas-Cartagena *et al.* 2005; dos Reis *et al.* 2009).

Lors de l'inflammation intestinale, les macrophages produisent également de l'IL-6 en grande quantité. Cette cytokine agit avec son récepteur soluble (soluble IL-6 receptor : sIL-6R). La liaison des deux protéines va permettre, par un système de trans-signalling, d'activer le facteur de transcription STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) malgré l'absence du récepteur de surface à l'IL-6. Ce système joue un rôle central dans le développement des réactions immunitaires lors de l'inflammation et une augmentation du taux circulant d'IL-6 et de sIL-6R a été corrélée avec les marqueurs cliniques de l'inflammation intestinale (Neuman 2007; Sanchez-Munoz *et al.* 2008). Le blocage de ce phénomène de trans-signalling a permis d'induire l'apoptose des lymphocytes T chez des patients atteints de MC (Van Kemseke *et al.* 2000). Les taux d'IL-6 dans les modèles animaux d'inflammation intestinale sont également fréquemment augmentés (Alex *et al.* 2009; Xu *et al.* 2009; Cho *et al.* 2010).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la présentation de l'antigène aux lymphocytes et par voie de conséquence la libération de cytokines pro-inflammatoires. Elle joue un rôle central dans la régulation de l'inflammation et son efficacité thérapeutique a été mesurée dans plusieurs modèles animaux d'inflammation intestinale (Wirtz *et al.* 2007b). De plus, il a été montré dans des biopsies de patients atteints de MC que les taux d'IL-10 étaient diminués (Schreiber *et al.* 1995). Cette diminution de l'IL-10 est également

mesurée dans les modèles expérimentaux d'inflammation intestinale (Liu *et al.* 2003; Okayama *et al.* 2007; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2010).

L'IL-4, cytokine à activité régulatrice, est connue comme facteur de stimulation des cellules B et est principalement produite par les lymphocytes activés. Elle a une activité immunorégulatrice et anti-inflammatoire et joue un rôle central dans l'immunité intestinale (Niessner *et al.* 1995). L'IL-4 influence les fonctions des lymphocytes et altère celles des monocytes : inhibition de la production d'H₂O₂ par les monocytes, production de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, TNF) (Rogler *et al.* 1998a). Au cours de l'inflammation intestinale, ces effets anti-inflammatoires sont atténués par la diminution des taux d'IL-4 dans les muqueuses (Karttunen *et al.* 1994; Xu *et al.* 2009).

Le TGF- β est une cytokine à activité inhibitrice qui a une fonction de régulation de la réponse inflammatoire. Il réduit la production d'EROs ainsi que la synthèse des autres cytokines. Il a également une fonction de régulation sur les lymphocytes en inhibant la prolifération des cellules T et B ainsi que la génération de cellules T cytotoxiques (Rogler *et al.* 1998a). Une réduction du taux de TGF- β est considérée comme responsable du développement de nombreux troubles auto-immuns dans des pathologies comme les MICI (Marek *et al.* 2002). De la même manière, des modèles expérimentaux d'inflammation ont été développés à partir de souris déficientes en TGF- β (Kulkarni *et al.* 1993).

c. Le facteur de transcription NF- κ B

En situation physiologique, les sous-unités du facteur de transcription NF- κ B sont séquestrées dans le cytoplasme par la famille des inhibiteurs I- κ B. Lors de la réaction inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) par leur fixation sur leurs récepteurs ont la capacité d'activer les voies de signalisation résultant en l'activation de l'I- κ B kinase (IKK) qui va ainsi phosphoryler I- κ B ce qui permettra sa dégradation par le système du protéasome. Les sous-unités de NF- κ B ainsi libérées peuvent gagner le noyau, se dimériser et assurer leur fonction de facteur de transcription (Atreya *et al.* 2008). Une augmentation de l'activation de ce facteur de transcription dans les macrophages et les cellules épithéliales associée à une augmentation de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6 a été rapportée chez des patients atteints de MC et de RCH et corrélée à la sévérité de l'inflammation (Rogler *et al.* 1998b; Atreya *et al.* 2008; Kaser *et al.* 2010). Cette activation de NF- κ B va induire la production d'autres cytokines qui vont ensuite activer les cellules

immunitaires présentes dans la muqueuse et en particulier les lymphocytes Th1 (Atreya *et al.* 2008).

Plus généralement, le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans les phénomènes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et d'inhibition de l'apoptose, ceci pouvant conduire à des phénomènes de carcinogenèse associés à l'inflammation (Naugler *et al.* 2008). L'augmentation de ce facteur de transcription a également été décrite dans les modèles animaux d'inflammation intestinale (Marrero *et al.* 2000; Ukil *et al.* 2006; Deguchi *et al.* 2007). Par ailleurs NF- κ B est également impliqué dans l'expression des cyclooxygénases (COX) et des nitric oxide synthases (NOS) (Aktan 2004; Wang *et al.* 2009).

d. La cyclooxygénase-2

Les deux isoformes de cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) catalysent, à partir de l'acide arachidonique, la production de prostanoïdes : prostaglandine D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2 α} (PGF_{2 α}), I₂ (PGI₂) et thromboxane (TX) (Kaser *et al.* 2010). COX-1 est présente de manière constitutive dans l'ensemble des tissus tandis que COX-2 n'est que faiblement présente et est surexprimée en réponse aux cytokines lors de l'inflammation (Singer *et al.* 1998). COX-2 est exprimée à la surface des cellules épithéliales ainsi que dans les cellules immunitaires de la *lamina propria* de patients atteints de MICI au cours des périodes actives d'inflammation (Hendel *et al.* 1997; Singer *et al.* 1998). Elle est également induite dans les modèles expérimentaux d'inflammation colique (Wang *et al.* 2008). Cette augmentation de COX-2 lors de l'inflammation se traduit par une augmentation du taux de PGE₂, médiateur de l'inflammation aiguë (Okayama *et al.* 2007; Sheibanie *et al.* 2007). Les prostanoïdes sont impliqués dans de nombreux processus pathophysiologiques : la modulation des réactions inflammatoires, l'ulcération gastrointestinale, l'angiogenèse ou la carcinogenèse pouvant faire suite à l'inflammation chronique (Wang *et al.* 2008).

e. La nitric oxyde synthase inducible

L'activation de NF- κ B induit également l'expression de l'iNOS induisant une augmentation de la production du monoxyde d'azote qui participe au phénomène du stress oxydant et a des effets anti-apoptotiques (Aktan 2004). L'iNOS est une des trois isoformes de NO synthases produisant le \bullet NO à partir de la L-arginine. Les eNOS et nNOS (endothelial et neuronal nitric oxyde synthases) ont une activité physiologique et produisent

du $\bullet\text{NO}$ à des concentrations de l'ordre du picomolaire tandis que l'iNOS le produit à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et est spécifiquement activée dans les conditions inflammatoires (van der Woude *et al.* 2004). Le $\bullet\text{NO}$ a des effets anti-apoptotiques et peut induire des altérations de l'ADN tout en inhibant les systèmes de réparation (van der Woude *et al.* 2004). L'activation de l'iNOS au cours de l'inflammation intestinale a été clairement établie au cours d'études menées chez l'homme (Singer *et al.* 1996; Dijkstra *et al.* 1998) ou dans des modèles animaux (Miller *et al.* 1995; Rachmilewitz *et al.* 1995; Krieglstein *et al.* 2001; Camuesco *et al.* 2004).

5. Stress oxydant et inflammation intestinale

a. Augmentation des espèces oxydatives dans l'intestin

Au cours des pathologies inflammatoires intestinales, l'infiltration de la *lamina propria* par les cellules inflammatoires (PNN et macrophages) est associée à la libération d'une grande quantité d'EROs et d'ERAs. Plusieurs études ont montré chez des patients atteints de MC ou de RCH que les observations cliniques et endoscopiques étaient positivement corrélées à l'augmentation d'EROs dans la muqueuse colique (Keshavarzian *et al.* 1992; Simmonds *et al.* 1992). Ceci a été confirmé par la mesure de l'augmentation des radicaux superoxydes issus des macrophages et des neutrophiles lors de RCH (Oshitani *et al.* 1993). L'anion superoxyde se dismute spontanément ou via l'action de la SOD en peroxyde d'hydrogène et l'augmentation de ce dernier a également été décrite dans la muqueuse de rats enflammés (Shi *et al.* 2011). De plus, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec les ions Fe^{2+} et Cu^+ et produire au cours de la réaction de Fenton le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$ hautement réactif (Damiani *et al.* 2007). L'augmentation de ce radical a été observée dans le côlon mais également dans le plasma dans un modèle azoxyméthane (AOM) chez la souris (Ashokkumar *et al.* 2008). De plus, l'acide hypochloreux HOCl est également produit en grande quantité par la MPO présente dans les neutrophiles qui infiltrent la muqueuse intestinale et dont l'activité est particulièrement élevée au cours des colites (Sertejn *et al.* 2003).

Par ailleurs, l'augmentation du taux de $\bullet\text{NO}$ ainsi que de l'activité de l'iNOS participent au développement du stress oxydant. En effet, des études menées chez des animaux enflammés ont montré que l'expression et l'activité de l'iNOS étaient augmentées dans le côlon (Oh *et al.* 2006; Holma *et al.* 2007; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). L'intensité

de la colite induite est moins sévère chez des souris C57BL/6-NOS2^{tm1la} iNOS déficientes, témoignant ainsi du rôle de l'expression de cette enzyme dans le phénomène pathologique (Krieglstein *et al.* 2001). Ceci se traduit par une augmentation du NO[•] dans les muqueuses coliques (Larrosa *et al.* 2009) ainsi que dans le plasma (Krieglstein *et al.* 2001; Oh *et al.* 2006).

La production excessive d'espèces oxydatives a plusieurs conséquences au cours de l'inflammation intestinale chronique. Elle induit en particulier une augmentation de la sécrétion d'électrolytes et d'eau au niveau intestinal se traduisant par de la diarrhée (Kruidenier *et al.* 2002) (**Figure 17**).

b. Altérations oxydatives induites lors de l'inflammation intestinale

b.1. Oxydation des lipides

Parmi les altérations oxydatives provoquées par le stress oxydant, une augmentation de la peroxydation lipidique a été mise en évidence dans diverses études. Ainsi certains auteurs observent une augmentation du MDA dans le plasma de patients atteints de MC et de RCH (Alzoghaibi *et al.* 2007; Baskol *et al.* 2008). Cette augmentation du MDA a également été observée dans la muqueuse colique au cours d'études menées dans des modèles expérimentaux (Carrier *et al.* 2002; Ashokkumar *et al.* 2008; Arafa *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009; Xu *et al.* 2009; Patel *et al.* 2010). D'autres auteurs observent une élévation du taux de 4-hydroxynonéal (Grisham 1994) ou des TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (Pelissier *et al.* 2006; Larrosa *et al.* 2009; Xu *et al.* 2009). Cette peroxydation lipidique est positivement corrélée avec le développement de la pathologie dans la plupart des cas (Rezaie *et al.* 2007).

b.2. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines est évaluée par l'augmentation des groupements carbonyles (Lih-Brody *et al.* 1996; Mercier *et al.* 2002) et de la 3-nitrotyrosine dans les cellules mononucléaires de la *lamina propria* témoignant de l'oxydation des protéines par le peroxy-nitrite au cours de la MC comme de la RCH (Kruidenier *et al.* 2002). Les produits avancés de l'oxydation des protéines ainsi que les thiols sont également augmentés dans le plasma de patients atteints de RCH (Baskol *et al.* 2008). Ce type d'oxydation est également décrit dans différents modèles animaux (Mercier *et al.* 2002; Pelissier *et al.* 2006).

b.3. Atteintes oxydatives de l'ADN

Des altérations oxydatives sont également détectées au niveau de l'ADN. L'adduit le plus fréquemment observé au cours de l'oxydation de l'ADN est le 8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-OHdG). Celui-ci est augmenté dans les biopsies de patients atteints de MC et de RCH (Lih-Brody *et al.* 1996; Kato *et al.* 2008). D'autre part, des altérations oxydatives à l'ADN ont également été décrites par le test des comètes (Jin *et al.* 2008; dos Reis *et al.* 2009).

Ainsi, au cours de l'inflammation intestinale, les altérations oxydatives touchent l'ensemble des macromolécules de la cellule.

c. Inflammation intestinale et altérations des défenses antioxydantes

c.1. Diminution de l'activité des enzymes antioxydantes

Face à l'augmentation des espèces oxydatives, de fortes augmentations des défenses antioxydantes peuvent paradoxalement avoir un effet négatif. En effet, la surexpression déséquilibrée d'une des enzymes antioxydantes peut augmenter la vulnérabilité des cellules face aux métabolites oxydatifs. Une augmentation de la SOD peut induire une déplétion en anion superoxyde associée à une augmentation du peroxyde d'hydrogène potentiellement délétère si les niveaux de CAT et de GPx ne sont pas suffisamment élevés pour le prendre en charge. Ceci a été mis en évidence lors d'une inflammation induite chez des souris C57BL/6-TgN(SOD1)3Cje dont la SOD est surexprimée (Krieglstein *et al.* 2001). Par ailleurs, une augmentation excessive de la GPx peut induire une déplétion en GSH ou en NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). Ainsi, il est nécessaire que les variations de ces défenses restent équilibrées pour gérer l'augmentation des EROs et ERAs.

Cependant, au cours de l'inflammation intestinale, les variations observées pour ces défenses ne semblent pas en faveur d'une correction du stress oxydant. Ainsi, plusieurs études montrent à la fois une diminution d'activité et d'expression de la SOD ne permettant pas la gestion de l'augmentation de l'anion superoxyde dans les muqueuses de patients atteints de MICI (Mulder *et al.* 1991; Lih-Brody *et al.* 1996; Dagli *et al.* 1997) ou dans des modèles murins (Oh *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006; Ashokkumar *et al.* 2008). Les résultats portant sur les activités CAT et GPx sont plus controversés. Certains auteurs montrent que celles-ci ne sont pas modifiées dans les muqueuses de patients (Bhaskar *et al.* 1995; Durak

et al. 2000) tandis que d'autres montrent une augmentation de la GPx dans les muqueuses enflammées (Iantomasi *et al.* 1994; Sturniolo *et al.* 1998). Les résultats des études menées sur les rongeurs sont plus homogènes et semblent indiquer, comme pour la SOD, que la CAT et la GPx ont une activité diminuée au cours de la colite (Oh *et al.* 2006; Ashokkumar *et al.* 2008).

c.2. Diminution des taux d'antioxydants non enzymatiques

Une diminution du taux de GSH total est observée dans les muqueuses enflammées en cas de RCH ou de MC (Buffinton *et al.* 1995) et l'analyse de son statut redox montre une augmentation de la forme dissulfide oxydée aux dépens de la forme réduite (Holmes *et al.* 1998). La diminution du taux de GSH réduit dans la muqueuse colique est également observée dans des études menées chez l'animal enflammé (Ko *et al.* 2005; Mustafa *et al.* 2006; Ashokkumar *et al.* 2008; Arafa *et al.* 2009). Chez des souris enflammées, une diminution du GSH et du ratio GSH/GSSG est observée dans le plasma, montrant ainsi un état oxydatif systémique (Oz *et al.* 2005). Au cours du phénomène inflammatoire, il a été montré que les autres antioxydants non enzymatiques tels que les vitamines C et E étaient également diminués (Ashokkumar *et al.* 2008).

Ainsi, au cours d'une inflammation intestinale, la production d'EROs et d'ERAs augmente. Associée à cela, la diminution des défenses antioxydantes, tant enzymatiques que non enzymatiques, favorise le stress oxydant et l'oxydation des structures lipidiques et protéiques ainsi que l'altération des brins d'ADN, l'ensemble étant potentiellement carcinogène.

6. Inflammation intestinale chronique et augmentation du risque de cancer colorectal

a. Généralités

Plus d'un million de nouveaux cas de cancer colorectal (CRC) sont diagnostiqués chaque année dans le monde. Le CRC est la troisième forme la plus commune de cancer et la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde (Terzic *et al.* 2010). Le CRC peut être classé en différentes catégories selon son origine. On observe des formes héréditaires de CRC qui représentent environ 20% des cas. Les formes les plus répandues sont les formes sporadiques (environ 80% des formes de CRC), en partie liées aux facteurs

environnementaux incluant les mutagènes de l'environnement et d'origine alimentaire ou encore certaines souches de la flore commensale. Enfin, la troisième forme est consécutive à l'inflammation intestinale (Colitis-associated cancer : CAC), elle représente 1 à 2% de l'ensemble des CRC (Kraus *et al.* 2009; Terzic *et al.* 2010).

Le CAC est difficile à traiter et présente un taux de mortalité élevé. Plus de 20% des patients développent un CAC dans les 30 ans suivant l'apparition d'une MICI et plus de 50% de ceux-là ne survivent pas. Le risque de développer un CRC en cas de MICI est principalement lié à la sévérité de l'inflammation intestinale : étendue et durée de la colite, histoire familiale de CRC sporadique et manifestation précoce de la pathologie (Kraus *et al.* 2009).

b. Lien entre inflammation intestinale et cancérogenèse

La relation entre inflammation intestinale et CRC est basée sur plusieurs observations :

- le développement des tumeurs se fait sur les sites d'inflammation chronique,
- les cellules inflammatoires ainsi que les cytokines et les chémokines sont présentes dans les tumeurs,
- la surexpression des cytokines et des chémokines peut induire la cancérogenèse,
- les mêmes cibles moléculaires et voies de signalisation sont activées ou arrêtées dans l'inflammation et les processus de carcinogenèse,
- les études épidémiologiques montrent une augmentation du facteur de risque de développement de cancer avec les états inflammatoires,
- les traitements anti-inflammatoires non-stéroïdiens réduisent l'incidence de la mortalité par cancer (Kraus *et al.* 2009) (**Figures 18 et 19**).

c. Implications moléculaires

Le passage d'un épithélium normal à un adénome puis à un carcinome est associé à des événements moléculaires impliquant des mutations d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs, l'expression anormale de nombreux gènes ou encore l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire (Kraus *et al.* 2009). La réponse inflammatoire continue lors de l'inflammation chronique se caractérise par la colonisation de la muqueuse intestinale par les macrophages et les PNN qui libèrent de grandes quantités

de cytokines et de chémokines influençant les processus de carcinogenèse (Seruga *et al.* 2008).

La fixation des cytokines à leurs récepteurs des cellules épithéliales induit l'activation des voies de signalisation oncogéniques telles que Akt ou mTOR. Les facteurs de transcription NF- κ B et STAT3 ainsi que le gène COX2 jouent un rôle particulièrement important dans l'induction du CRC. Les cytokines principales jouant un rôle dans le développement de tumeurs associées à l'inflammation intestinale sont le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 (Terzic *et al.* 2010). La plupart des cytokines impliquées dans le développement tumoral sont activées via le facteur de transcription NF- κ B ou l'activation de sa voie de signalisation dans les cellules préumorales ou inflammatoires (Karin 2006). L'activation de NF- κ B favorise le développement tumoral en augmentant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, en inhibant la mort cellulaire et en favorisant l'invasion cellulaire et le développement de métastases (Naugler *et al.* 2008).

De nombreuses formes de cancer sont associées à des taux élevés de prostaglandines dus à une sur-régulation de l'expression COX-2. Au cours de la cancérogenèse colique, l'expression de COX-2 est augmentée (que ce soit dans les biopsies de tumeurs ou dans les études expérimentales chez l'animal). Les effets pro-tumoraux de COX-2 passent par son produit terminal principal la PGE₂ dont la concentration est particulièrement élevée dans les tumeurs colorectales. Ses effets protumoraux sont une inhibition de l'apoptose par stimulation de Bcl2 et une activation par PGE₂ de la voie de signalisation β -catenin qui favorise la survie et la prolifération. (Kraus *et al.* 2009; Terzic *et al.* 2010).

d. Stress oxydant et cancérogenèse

Au cours d'une inflammation persistante, le stress oxydant se développe plus particulièrement via la production d'EROs et d'ERAs par les cellules de l'inflammation comme les PNN et les macrophages. Cette augmentation du stress oxydant peut conduire à une dysplasie suivie de carcinome. Ce lien s'explique, en partie, par l'effet que peuvent avoir les espèces réactives sur l'ADN comme cela a été évoqué précédemment. Les espèces oxydatives générées par les cellules inflammatoires interagissent avec certains gènes clés impliqués dans les voies de signalisation de la carcinogenèse tels que p53 ou les gènes de réparation des mésappariements (Goodman *et al.* 2004). Parmi les espèces oxydatives, le monoxyde d'azote joue également un rôle prédominant dans la carcinogenèse via l'activité

de l'iNOS (Seril *et al.* 2007) qui induit des réactions de nitration et de désamination des bases. Il a également été montré que le $\cdot\text{NO}$ induisait l'inhibition des protéines de réparation. Les adduits oxydés les plus fréquemment observés dans les tissus humains sont les 8-OHdG. Ces modifications de bases sont fréquentes dans les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes mutés. La peroxydation lipidique induit également des atteintes à l'ADN. Les aldéhydes, comme le 4-hydroxy-2-nonéanal ou le MDA peuvent réagir directement avec les bases donnant des adduits pro-mutagènes. L'ensemble de ces altérations favorise donc à la fois les mutations pro-carcinogènes, l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, la croissance des cellules tumorales, l'angiogenèse ainsi que la dispersion des cellules et permet ainsi le lien entre inflammation chronique et développement du cancer colorectal (Seril *et al.* 2003; Kraus *et al.* 2009; Ferguson 2010) (**Figure 20**).

D. Les modèles animaux d'étude de l'inflammation intestinale

1. Principales caractéristiques du modèle

L'étiologie des MICI n'étant pas encore complètement connue et le développement de nouveaux outils thérapeutiques nécessaire, l'utilisation de modèles d'études animaux est indispensable. Au cours des vingt dernières années, plus de 20 modèles expérimentaux présentant des ressemblances plus ou moins marquées avec les manifestations cliniques des MICI ont été développés. La définition du modèle animal idéal pour l'inflammation intestinale a été donnée par Strober en 1985. Un modèle animal d'inflammation intestinale doit regrouper certaines caractéristiques clefs : des altérations morphologiques de l'intestin, un état inflammatoire, des symptômes et signes caractéristiques, une physiopathologie et un développement similaire ou identique aux MICI humaines (Strober 1985). Selon leurs caractéristiques, les modèles expérimentaux permettent l'étude de différents mécanismes pathophysiologiques ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les modèles d'études d'inflammation intestinale peuvent être classés en 5 groupes différents : les modèles porteurs de gènes knock-out (KO), les modèles de souris et de rats transgéniques, les modèles d'inflammation intestinale spontanée, les modèles de transfert adoptif et les modèles d'inflammation intestinale induite (Jurjus *et al.* 2004) (**Tableau 1**).

2. Les modèles d'animaux Knock-Out (KO)

Cette catégorie comprend principalement des modèles de souris. Les souris KO pour l'IL-2 (souris interleukin-2 KO/IL-2 receptor (R) α KO) permettent l'induction d'une inflammation chronique localisée au niveau du côlon. Celui-ci est sévèrement affecté avec des ulcères et un épaissement de la paroi intestinale. Comme les MICI, la pathologie se caractérise par des abcès cryptiques, une déplétion en mucine, une dysplasie des cellules épithéliales. Par ailleurs, une infiltration par les cellules T activées et par les cellules B dont l'expression du CMH de classe II est augmentée ainsi qu'une augmentation des IgG1 et IgE ont également été observées (Sadlack *et al.* 1993).

Les souris KO pour l'IL-10 développent une inflammation sur l'ensemble de l'intestin. Les lésions sont principalement observées au niveau du duodénum, du jéjunum et du côlon ascendant. L'IL-10 est impliquée dans la régulation de la fonction des cellules T helper, des lymphocytes T Natural Killer et des macrophages. Dans le côlon de ces souris, on observe une déplétion en cellules caliciformes, une dégénération de l'épithélium, une infiltration de cellules productrices d'IgA ainsi que une augmentation de l'expression du CMH de classe II (Kuhn *et al.* 1993).

D'autres modèles de souris KO pour le TCR ou pour la partie 3' non traduite du TNF- α sont également utilisés pour l'étude des MICI (Jurjus *et al.* 2004).

3. Les modèles de souris et de rats transgéniques

L'IL-7 issue des cellules épithéliales est une cytokine essentielle au fonctionnement de ces cellules ainsi qu'aux lymphocytes intraépithéliaux ou infiltrés dans la muqueuse intestinale. Les souris transgéniques pour l'IL-7 surexpriment l'ARNm correspondant et développent une inflammation aiguë à l'âge de 1 à 3 semaines caractérisée par une infiltration de neutrophiles et de cellules T CD4⁺ dans l'intestin. De plus, de forts niveaux d'expression de l'IL-7 sont détectés dans les régions enflammées de l'intestin chez ces souris (Jurjus *et al.* 2004).

Les souris transgéniques pour les molécules de la famille STAT sont également utilisées pour le développement de l'inflammation intestinale. Chaque molécule de la famille STAT est impliquée dans les signaux de transduction de plusieurs cytokines. STAT-

4 est plus particulièrement liée à l'IL-12 et les souris surexprimant STAT-4 génèrent des modèles d'inflammation colique de type Th-1 (Wirtz *et al.* 1999).

Le rat transgénique HLA-B27 est à ce jour l'unique modèle transgénique de rat pour l'inflammation intestinale. Cette souche est modifiée pour l'HLA-B27, une molécule humaine impliquée dans les spondyloarthropathies, ainsi que pour la β 2-microglobuline et développe spontanément une inflammation qui affecte l'estomac, l'iléon ainsi que la totalité du côlon. Une hyperplasie des cryptes et une infiltration de la muqueuse par les cellules inflammatoires mononucléaires sont observées. Ce modèle a été largement utilisé dans l'étude de l'effet des bactéries de la flore lors des phases aiguës et chroniques de l'inflammation intestinale (Rath *et al.* 1999).

4. Les modèles de colites spontanées

La souche de souris C3H/HeJBir développe spontanément une colite limitée à des lésions iléo-cæcales et coliques à l'âge de 3 à 4 semaines. Elle disparaît après 10 à 12 semaines. Ces souris présentent des ulcérations, des abcès cryptiques et une régénération de l'épithélium. Une augmentation des taux d'IFN- γ et d'IL-2 dans les lymphocytes de la *lamina propria* est également observée, suggérant que ces souris développent une réponse immunitaire de type Th-1 (Cong *et al.* 1998).

La souche de souris SAMP1/Yit développe également spontanément une inflammation chronique de l'iléon terminal ressemblant à la MC. La souche secondaire SAMP1/YitFc présente un phénotype différent avec une apparition de l'inflammation plus précoce (dès l'âge de 10 semaines), une inflammation chronique de l'iléon accompagnée d'une hypertrophie musculaire et de dépôts de collagène et une forte production d'IFN- γ détectée dès 4 semaines et précédant l'inflammation (Rivera-Nieves *et al.* 2003).

5. Les modèles de transfert adoptif

Le transfert de lymphocytes T CD8+ préactivés par la protéine bactérienne hsp60 chez des souris TCR γ δ ^{-/-} ou des souris immunodéficientes SCID, induit une pathologie intestinale fréquemment létale, localisée principalement dans l'intestin grêle. Le développement de la pathologie chez ces souris requiert la présentation de l'hsp60 au CMH de classe I et dépend du rôle fonctionnel du TNF- α et non de la présence de la flore entérale (Steinhoff *et al.* 1999; Jurjus *et al.* 2004).

Le modèle de transfert de lymphocytes T CD4⁺ exprimant fortement la molécule de surface CD45RB (CD4⁺ CD45RB^{hi}) résulte en une atteinte se manifestant par un affaiblissement général et une diarrhée chronique sans saignements. Ces effets se manifestent dans les semaines suivant le transfert et la pathologie conduit à terme à la mort de l'animal. Les modifications histologiques induites sont similaires à celles observées dans les autres modèles et principalement limitées au côlon qui, suite à l'hyperplasie, est nettement épaissi (Jurjus *et al.* 2004).

6. Les modèles d'inflammation inductible

De nombreux modèles sont basés sur l'induction de l'inflammation intestinale par l'utilisation d'agents chimiques. Ces agents peuvent être administrés par instillation rectale ou par voie orale. Ces modèles constituent la majorité des modèles utilisés pour l'étude de l'inflammation intestinale.

a. Induction par instillation d'acide acétique

La nécrose de l'épithélium ou de la muqueuse ainsi qu'une inflammation transitoire peuvent être induits par l'instillation rectale d'acide acétique dilué et ce de manière dose-dépendante. L'acide acétique est utilisé à des concentrations et des temps d'exposition variables, mais la plupart des études utilisent une exposition de 15 à 30 s et une concentration de 4 à 5%. Les atteintes initiales dans ce modèle sont une nécrose épithéliale relativement faible accompagnée d'œdème. Ces atteintes peuvent s'étendre à la *lamina propria*, à la sous-muqueuse ou aux couches musculaires selon les concentrations et les temps d'exposition utilisés (Jurjus *et al.* 2004).

b. Induction par instillation d'iodoacétamide

L'instillation d'iodoacétamide comme modèle d'inflammation intestinale est basée sur l'implication de composés soufrés, comme le GSH, dans la protection de la muqueuse intestinale. L'iodoacétamide est un agent bloquant les groupements SH et permet ainsi l'induction d'une colite par diminution des composés soufrés protecteurs. Cet agent chimique induit ainsi une inflammation caractérisée par de la diarrhée, des atteintes de la muqueuse d'intensité variable (de l'érosion à la lésion profonde) et une diminution de la prise de poids (Satoh *et al.* 1997).

c. Induction par instillation d'haptènes

c.1. *L'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS)*

L'inflammation intestinale peut être induite chez certaines souches animales sensibles par instillation rectale d'une substance jouant le rôle d'haptène telle que l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) en solution dans l'éthanol, ce dernier permettant la rupture de la barrière muqueuse. Le TNBS intervient en tant qu'haptène en se liant aux protéines microbiennes et tissulaires. Ceci permet la mise en place d'une réaction immunitaire de type Th1 constituant un modèle de MC (Neurath *et al.* 2000). Dans ce modèle, les cellules T CD4+ jouent un rôle central lors de la réaction inflammatoire. Ainsi le TNBS est particulièrement intéressant dans l'étude des réponses immunitaires dépendant des cellules T helper (Wirtz *et al.* 2007a).

c.2. *L'oxazolone*

L'oxazolone est également utilisée comme un haptène et administrée diluée dans l'éthanol par instillation rectale pour induire des colites aiguës chez le rat ou la souris. Ce modèle se caractérise par une perte de poids, une diarrhée, la perte des cellules caliciformes et par un taux de mortalité élevé. L'inflammation obtenue affecte la partie distale du côlon. Les atteintes histologiques ainsi que la production élevée de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) sont proches de ce qui est observé dans les cas de RCH. Ce modèle est plus particulièrement utilisé pour l'étude de la réponse immunitaire Th2-dépendante (Wirtz *et al.* 2007a).

d. Induction par administration orale d'indométacine

L'administration orale d'indométacine entraîne des ulcérations de l'intestin grêle et du côlon chez les rongeurs. Les atteintes épithéliales sont induites par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines protectrices : PGE₁, PGE₂ et prostacycline. Les bactéries de la lumière et leurs produits participent également à la réaction inflammatoire dans ce modèle. Il permet d'induire facilement une inflammation aiguë ou chronique de l'intestin grêle et du côlon qui peut être associée à des lésions extra-intestinales (Elson *et al.* 1995).

e. Induction par administration orale de sulfate de dextran sodique

Ce modèle est décrit en détail dans le paragraphe suivant.

7. Inflammation colique induite par administration de sulfate de dextran sodique

Le modèle d'inflammation intestinale induite par l'administration de sulfate de dextran sodique (DSS) dans l'eau de boisson a été décrit en 1990 (Okayasu *et al.* 1990). Le DSS est un polysaccharide sulfaté composé de dextran et d'unités d'anhydroglucose sulfatées (Ishioka *et al.* 1987). Il contient 17% de soufre avec plus de 3 molécules de sulfate par molécule de glucose (Ricketts 1952). Largement utilisé chez les rongeurs comme le rat, la souris, le hamster ou le cochon d'Inde, il est administré dans la boisson des animaux à des concentrations et pour des durées variables selon le type d'inflammation colique souhaité.

L'inflammation induite par le DSS se caractérise par une atteinte initiale aiguë de la muqueuse colique avec érosion, abcès cryptiques, œdème. Utilisé en modèle d'inflammation chronique, l'alternance répétée d'administration de DSS et d'eau seule induit des zones de régénération de la muqueuse conduisant à la dysplasie (Okayasu *et al.* 1990).

a. Le mode d'action du DSS

Le mécanisme d'action précis du DSS permettant l'induction de l'inflammation colique n'a pas encore été entièrement décrit. Cependant, il semblerait que cet agent induise une destruction des structures épithéliales de la muqueuse par son action toxique sur les entérocytes (Wirtz *et al.* 2007b) comme cela a pu être montré *in vitro* sur la lignée Caco-2 (Araki *et al.* 2006). Rapidement après l'altération de la muqueuse, les macrophages développent l'inflammation en colonisant le tissu et en interagissant avec les lymphocytes T (Hall *et al.* 2011). Par ailleurs, l'action du DSS n'est pas due à sa dégradation par la flore commensale puisqu'il a été montré que celle-ci n'avait aucun effet dégradant sur l'agent chimique (Kitajima *et al.* 2002).

Les réponses à l'administration de DSS varient selon divers paramètres tels que le poids moléculaire du DSS utilisé, la concentration à laquelle l'agent chimique est dilué dans la boisson des animaux, la durée de l'administration, l'espèce et la souche animale utilisées (Vowinkel *et al.* 2004).

b. Facteurs influençant l'action du DSS

b.1. Le poids moléculaire

Les analyses histologiques menées sur des côlons de souris Balb/c ayant reçu des solutions de DSS de poids moléculaires différents (5 kDa, 40 kDa et 500 kDa) à 5% pendant 7 jours ont montré des différences dans l'inflammation développée (Kitajima *et al.* 2000). Le DSS de 500 kDa n'a pas d'effet toxique sur la muqueuse colique tandis que les deux autres formes induisent des inflammations intestinales caractérisées par la perte des cryptes, l'infiltration de la muqueuse et de la sous-muqueuse par les cellules inflammatoires, l'œdème de la sous-muqueuse et l'érosion et l'ulcération de l'épithélium. Chez les animaux recevant le DSS de 5 kDa, l'inflammation se situe principalement dans le cæcum et la partie supérieure du côlon tandis que la forme de 40 kDa induit une inflammation plus sévère nettement plus marquée dans la partie inférieure du côlon (Kitajima *et al.* 2000). Le recensement des études travaillant avec le modèle DSS montre que la plupart utilise un DSS de poids moléculaire d'environ 40 kDa (**Tableaux 2 et 3**).

b.2. La concentration en DSS

La concentration en DSS dans l'eau de boisson joue également un rôle prépondérant dans le développement de l'inflammation intestinale.

Parmi les plus fortes concentrations utilisées, celle de 10% initialement utilisée chez la souris Balb/c a permis l'induction d'une colite associée à une perte de poids et à des saignements rectaux dans un délai de 8 à 9 jours (Okayasu *et al.* 1990). Par ailleurs, l'étude de Cooper *et al.* sur des souris Webster a montré l'apparition de signes d'inflammation au cinquième jour d'administration à la dose de 5% (Cooper *et al.* 1993). Cet effet de la concentration de DSS sur le développement de l'inflammation a pu être confirmé dans les études utilisant simultanément plusieurs concentrations. Ainsi il a été montré chez des rats récemment sevrés que les signes cliniques d'inflammation intestinale apparaissaient au troisième jour de consommation de DSS à 4% tandis qu'ils sont observés après cinq jours lorsque la concentration est de 1% (Shimizu *et al.* 2003). De plus, une étude sur des souris Balb/c avec des concentrations de DSS de 2,5%, 5% et 7,5% a montré que la sévérité de la colite n'était pas corrélée à la quantité de DSS consommée mais à la concentration de celui-ci dans la boisson des souris (Egger *et al.* 2000). Enfin, Vowinkel *et al.* ont montré chez des souris C57BL6/J recevant du DSS à 3 et 5% que l'intensité de l'inflammation était

directement liée à la charge de DSS à laquelle est confrontée la muqueuse colique. Ainsi, ces auteurs ont calculé la charge de DSS directement liée au poids des animaux :

$$\text{Charge DSS} = \frac{\text{volume consommé total (ml)} \times \frac{\text{DSS (g)}}{100 \text{ ml}}}{\text{poids initial des rats (g)}}$$

Cette étude a ainsi mis en évidence que l'activité MPO (marqueur de l'inflammation intestinale) était d'autant plus forte que la charge de DSS était supérieure à 30 mg de DSS/g de poids vif. Les animaux recevant une charge inférieure affichaient également une activité MPO augmentée mais qui n'atteignait pas le seuil de significativité comparativement aux animaux sains (Vowinkel *et al.* 2004). Ainsi, plus que la quantité de DSS consommé, il s'agit bien de la concentration en DSS dans la boisson en lien avec le poids des animaux qui est responsable de la sévérité de l'inflammation induite.

b.3. La durée d'exposition

La progression de l'inflammation dépend du temps d'exposition de la muqueuse colique au DSS (Cooper *et al.* 1993). En effet, il a été montré que les premières modifications histologiques précédant l'apparition de signes cliniques telles que l'atteinte des cryptes apparaissaient au troisième jour suivi au quatrième d'une infiltration de la muqueuse par les cellules inflammatoires. Les érosions les plus étendues associées à un épithélium régénératif et à une forte infiltration cellulaire étaient observées au cours des derniers jours d'induction de l'inflammation (Cooper *et al.* 1993). Par ailleurs, ce modèle permet l'induction d'une inflammation chronique en alternant les périodes de consommation de DSS et d'eau seule. Cette approche expérimentale permet ainsi l'induction de zones d'érosion associées à de nombreuses zones de régénération en partie dysplasique ainsi que la formation de follicules lymphoïdes (Okayasu *et al.* 1990).

b.4. Les espèces et les souches animales

Des variations dans la réponse inflammatoire existent également en fonction de l'espèce animale utilisée et de la souche choisie au sein de l'espèce. En effet, des différences peuvent exister entre les espèces dans les délais d'apparition des signes cliniques de l'inflammation. Ainsi, on observe que les concentrations de DSS administrées aux souris sont fréquemment plus faibles que celles administrées aux rats. De la même manière, des

différences existent entre les animaux jeunes et plus âgés. Ces différences s'expliquent en partie par la théorie précédemment évoquée, selon laquelle la charge de DSS en fonction du poids de l'animal joue un rôle prépondérant sur le développement de l'inflammation (Vowinkel *et al.* 2004). Ceci a été observé dans l'étude de Shimizu *et al.* (2003) qui administre différentes concentrations de DSS à de jeunes rats et montre, qu'à concentration égale, ils sont plus sensibles que les rats adultes. De plus, au sein d'une même espèce, des variations en fonction des souches existent. Cela a été mis en évidence au cours d'une même étude menée sur 9 souches de souris différentes recevant du DSS à 3,5% pendant cinq jours et sacrifiées au seizième jour (Mahler *et al.* 1998). Les résultats montrent que les souris C3H/HeJBr sont les plus sensibles au DSS avec une colite bien développée dans le cæcum et le côlon médian. Les souris C57BL/6J, couramment utilisées par ailleurs, sont également particulièrement sensibles et développent une inflammation préférentiellement située dans le côlon médian et distal. A l'opposé, les souris de souche NOD/LtJ n'affichent aucune réponse à l'administration de DSS. Cette étude a également montré que les mâles étaient plus sensibles à l'agent toxique que les femelles (Mahler *et al.* 1998). De la même manière, il a été montré que lors d'une utilisation chronique du DSS, les symptômes disparaissaient plus rapidement chez la souris BALB/c que chez la souris C57BL/6 (Melgar *et al.* 2005).

c. Caractéristiques de l'inflammation induite par le DSS

c.1. Les signes cliniques

Différents paramètres surveillés sur l'animal au cours de l'expérimentation permettent de contrôler et de mesurer le développement et la sévérité de l'inflammation induite (**Tableaux 2 et 3**). Celle-ci se manifeste par la diminution de la consommation alimentaire associée à une chute de la prise de poids, voire à une perte de poids (Kullmann *et al.* 2001). De plus, le DSS induit une modification progressive de la consistance des fèces allant jusqu'à la diarrhée caractéristique de la colite. L'inflammation se caractérise également par la présence de sang dans les selles, tout d'abord indécélable à l'œil nu puis visible dans les crottes ainsi qu'au niveau anal. Ces paramètres (perte de poids, consistance et présence de sang dans les selles) sont intégrés dans le calcul d'un score, le « disease activity index » (DAI) (Cooper *et al.* 1993), qui permet ainsi d'évaluer la sévérité de l'inflammation au long de l'expérimentation (Kullmann *et al.* 2001; Wirtz *et al.* 2007a). Dans un modèle d'inflammation chronique alternant les phases de consommation de DSS avec des phases de consommation d'eau seule, la diminution de la prise de poids ou la

consistance des selles tendent à s'améliorer lors des phases de rémission (Gaudio *et al.* 1999). Cependant, leur apparition est plus rapide après un deuxième et un troisième cycle de DSS et leur disparition se fait alors plus lentement. Par ailleurs, la perte de poids des animaux est plus franche après le premier cycle de DSS et moins marquée lors des cycles suivants (Gaudio *et al.* 1999; Vetuschi *et al.* 2002).

c.2. Les atteintes macroscopiques

Certaines études ont évalué les modifications structurales et ultra-structurales qui apparaissent lors de l'inflammation aiguë ou chronique induite par le DSS, à des niveaux macroscopiques (observation des côlons) et microscopiques (analyses histologiques).

De manière générale, une diminution de la longueur des côlons est observée (Solomon *et al.* 2010) et fréquemment utilisée comme marqueur de l'inflammation (**Figure 21**). Au cours d'une inflammation aiguë, on observe des muqueuses œdémateuses ainsi que la présence de zones d'érosion hémorragiques dispersées tout au long du côlon. Des zones d'ulcération sont également détectées, principalement dans le rectum mais aussi dans le cæcum (Gaudio *et al.* 1999).

Lorsque le DSS est utilisé en alternance avec de l'eau afin d'induire une inflammation chronique, les zones d'érosion apparaissent plus nombreuses et sont étendues au côlon ascendant. Les zones d'ulcération du rectum et du cæcum observées en phase aiguë sont également présentes lors d'une atteinte chronique. Toutefois, après des périodes d'alternance plus longues et plus nombreuses, l'étendue des zones visibles d'inflammation de la muqueuse sont plus réduites (Gaudio *et al.* 1999; Kullmann *et al.* 2001; Vetuschi *et al.* 2002).

c.3. Les atteintes histologiques

L'analyse histologique de l'inflammation en microscopie optique après coloration des tissus permet de caractériser l'atteinte tissulaire induite par le DSS. Après une phase d'inflammation aiguë, la plupart des atteintes observées sont majoritairement présentes dans la partie distale du côlon. Les observations mettent en évidence une érosion ainsi qu'un amincissement de l'épithélium de surface associés à une dilatation des cryptes. La muqueuse est infiltrée par les cellules immunitaires, principalement les PNN et les macrophages ; elle présente également des zones œdémateuses. On note également une

perte de cellules caliciformes, la présence focale d'abcès cryptiques ou de congestion vasculaire. L'inflammation peut parfois avoir une étendue transmurale (Gaudio *et al.* 1999; Kullmann *et al.* 2001; Vetuschi *et al.* 2002) (**Figure 22**).

Après plusieurs cycles de DSS, la muqueuse colique apparaît globalement désorganisée avec des zones dépourvues d'épithélium de surface. De nombreuses glandes ont été détruites par l'inflammation et celles restantes apparaissent dilatées et atrophiques. Certaines zones en sont totalement dépourvues. Les auteurs notent peu de cellules caliciformes. Après plusieurs cycles d'alternance DSS/eau, certains signes de dysplasie commencent à apparaître. De manière générale, les atteintes se font principalement dans la partie distale du côlon lors des premières phases d'induction. L'inflammation induite par le DSS se développe en gradient de sévérité distale à proximale et les parties moyennes et proximales du côlon sont concernées par les atteintes lors de la répétition des cycles d'administration du DSS (Gaudio *et al.* 1999; Kullmann *et al.* 2001; Vetuschi *et al.* 2002).

L'ensemble de ces altérations est généralement mesuré par un système de score qui évalue la présence et l'étendue de chacun de ces paramètres sur une échelle de 0 à 3 (Okayasu *et al.* 1990).

c.4. Un marqueur de l'inflammation intestinale, l'activité myéloperoxydase

Comme précisé dans le chapitre III.4.a, le dosage de l'activité de la MPO est considéré comme un marqueur de l'inflammation intestinale dans la mesure où il reflète l'infiltration de la muqueuse par les PNN (Okayasu *et al.* 1990). L'infiltration des PNN dans la muqueuse de rongeurs auxquels le DSS a été administré est également connue (Gaudio *et al.* 1999; Solomon *et al.* 2010). L'augmentation d'activité MPO reflétant cette infiltration par les PNN a été décrite dans de nombreuses études menées sur le modèle DSS que ce soit chez le rat pour des concentrations allant de 0,5 à 7% (Iba *et al.* 2003; Vicario *et al.* 2005; Van Crombruggen *et al.* 2008) ou chez la souris pour des concentrations en DSS de 2 à 5% (Farkas *et al.* 2001; Deguchi *et al.* 2007; Singh *et al.* 2009).

d. Le profil immunitaire

Bien qu'il soit couramment utilisé, le modèle DSS n'est pas encore totalement caractérisé en ce qui concerne la réponse immunitaire déclenchée au niveau local ou systémique. Selon le type d'inflammation induite, aiguë ou chronique, les études portant sur

la caractérisation de la réponse immunitaire dans ce modèle ont montré que les populations cellulaires impliquées étaient différentes.

Dans un premier temps, une étude menée sur des souris SCID immunodéficientes a montré que le DSS induisait une inflammation aiguë en l'absence de lymphocytes T et B (Dieleman *et al.* 1994). Un rôle prépondérant des macrophages dans la phase d'initiation de l'inflammation a été évoqué suite à l'observation de ces cellules dans la muqueuse (Okayasu *et al.* 1990). Ceci a été confirmé par la détection de la migration de ces cellules mais également des neutrophiles et des cellules dendritiques au niveau colique ou dans les structures lymphoïdes comme le thymus et les ganglions mésentériques dès le premier jour de consommation du DSS (Hall *et al.* 2011) (**Figure 23**).

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie et dans le renouvellement épithélial dans les tissus sains. Lors de la phase aiguë induite par le DSS, un afflux de ces cellules dans le côlon ainsi qu'une augmentation de leur activation semblent participer au développement des atteintes tissulaires (Singh *et al.* 2010; Hall *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011). Par la suite, les macrophages sont en contact étroit avec les cellules T lors de la phase de consommation d'eau dans un modèle d'inflammation chronique induite par le DSS (Hall *et al.* 2011).

Les cellules dendritiques, impliquées dans la phase innée de l'inflammation, induisent et régulent les réponses immunitaires. Lors des premiers jours d'induction de l'inflammation par le DSS, Hall *et al.* (Hall *et al.* 2011) observent un afflux de ces cellules dans les ganglions mésentériques associé à une augmentation de leur activation comme cela a été décrit chez des patients atteints de RCH (Niess 2008). De plus, de nombreuses données soulignent le rôle prépondérant des cellules dendritiques dans l'activation des cellules T ainsi que dans l'orientation de la réponse immunitaire dans les voies Th1, Th2 ou Th17 (Niess 2008). Par la suite, la proportion de cellules dendritiques diminue dans les structures lymphoïdes secondaires pour regagner le côlon. De plus, parmi les cellules de l'immunité innée, les cellules dendritiques sont les seules à afficher une interaction avec les cellules B productrices d'anticorps (Hall *et al.* 2011) (**Figure 23**).

Le développement de l'inflammation passe également par la migration transépithéliale des neutrophiles (Farkas *et al.* 2001; SerTEyn *et al.* 2003) qui colonisent rapidement la muqueuse afin de phagocyter l'agent pro-inflammatoire. Cependant, il semblerait que les PNN jouent également un rôle d'activation des cellules de l'immunité

adaptative dans la mesure où ils sont observés en colocalisation avec les cellules T dans la muqueuse lors de la phase aiguë de la colite. Au cours de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, leur migration dans les ganglions mésentériques, où se fait la maturation des cellules T naïves, est également mise en évidence (Hall *et al.* 2011).

La colocalisation de CPA comme les cellules dendritiques ou les macrophages avec les lymphocytes T lors de la phase aiguë suggérerait ainsi leur activation et le rôle de l'immunité adaptative lors du passage à la chronicité. Ces mêmes auteurs montrent après 6 jours de DSS suivis de 2 jours de consommation d'eau par des souris, une diminution des PNN et des macrophages dans la muqueuse associée à une augmentation des lymphocytes T et à une diminution de ces mêmes cellules dans les ganglions mésentériques (Hall *et al.* 2011). Ceci confirme les mouvements des cellules T suite à leur activation par les CPA. L'implication des lymphocytes T dans la phase chronique de l'inflammation a été montrée dans plusieurs études mettant en évidence ces cellules dans la muqueuse intestinale lors des phases de régénération (Dieleman *et al.* 1998; Singh *et al.* 2010; Hall *et al.* 2011). La présence de ces cellules est associée à l'augmentation des taux des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-17 (Melgar *et al.* 2005; Hall *et al.* 2011) (**Figure 23**).

e. DSS et médiateurs de l'inflammation

e.1. La production de cytokines

Les mouvements cellulaires décrits au cours de la réaction inflammatoire sont en partie régulés par les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires. De manière générale au cours de cette étape, ce sont les cytokines pro-inflammatoires de type Th1 qui sont dominantes dans le côlon (Blumberg *et al.* 1999). Ainsi de nombreux auteurs ont observé une augmentation des concentrations en IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-8, IFN- γ et TNF- α après induction de l'inflammation par du DSS à des concentrations allant de 2,5 à 5% (Arai *et al.* 1998; Dieleman *et al.* 1998; Egger *et al.* 2000; Kwon *et al.* 2005b; Camuesco *et al.* 2006; Sadakane *et al.* 2010; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). Récemment, il a été montré que la sécrétion de ces cytokines (IL-1 β , IL-8, TNF- α) était augmentée dans la muqueuse colique par le DSS mais que celui-ci n'augmentait pas leur sécrétion dans la musculature (Shi *et al.* 2011).

Le DSS a également des effets sur la production de cytokines modulatrices comme l'IL-10 dont il induit la diminution (Sadakane *et al.* 2010; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010).

D'autre part, il a été montré dans la muqueuse colique seule, une faible augmentation de la sécrétion d'IL-4 après 7 jours d'administration de DSS à 5% (Shi *et al.* 2011).

L'effet du DSS sur les médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines se répercute également à l'échelle systémique. En effet, les taux sériques d'IL-1 β , IL-6, IFN- γ et TNF- α sont augmentés et celui de l'IL-4 diminué (Krieglstein *et al.* 2001; Xu *et al.* 2009; Singh *et al.* 2010).

Toutefois, administré à forte dose (7,5 %) pendant 7 jours à des souris BALB/c, le DSS provoque une diminution de l'expression de ces cytokines Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-1 et TNF- α) associée à une augmentation de cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et plus faiblement l'IL-10. Celle-ci est connue pour avoir une activité régulatrice et peut avoir un effet inhibiteur sur les cellules T et limiter ainsi la libération des cytokines pro-inflammatoires (Egger *et al.* 2000). Ainsi, tandis que les MICI sont caractérisées par des profils cytokiniques distincts (Th1/Th17 pour la MC et Th2 pour la RCH), il semble que le modèle DSS implique à la fois des cytokines Th1 et Th2 selon le mode d'utilisation (concentration, durée d'administration, induction d'inflammation aiguë ou chronique) (Dieleman *et al.* 1998).

e.2. Activation de NF- κ B

Le marquage immunohistochimique de la sous-unité p65 a montré la présence du facteur de transcription dans les noyaux des cellules épithéliales et inflammatoires de la muqueuse colique suite à l'administration de DSS à 3,5% chez la souris (Deguchi *et al.* 2007). Par western blot, une augmentation de la phosphorylation d'I- κ B a été observée dans le côlon suite à l'administration de DSS à 4% chez la souris (Zhao *et al.* 2010). Des mesures en immunohistochimie ont confirmé une forte présence de l'IKK α , chargée de phosphoryler I- κ B, dans les cellules épithéliales ainsi que dans la sous-muqueuse de souris recevant le DSS à 4% (Nam *et al.* 2008). Cette activation de NF- κ B dans la muqueuse intestinale a également été décrite dans la muqueuse intestinale de rats recevant du DSS à 4% (Yomogida *et al.* 2008) ou à 5% (Camuesco *et al.* 2004).

e.3. COX-2 et iNOS

L'effet du DSS peut également se mesurer par l'augmentation de l'expression des enzymes COX-2 et iNOS ainsi que par l'augmentation des concentrations de leurs produits,

PGE₂ et [•]NO au niveau colique. L'augmentation de COX-2 associée à une augmentation de PGE₂ ont été décrites au cours d'études menées chez le rat recevant du DSS à 5% (Larrosa *et al.* 2009) et à 2,5% (Okayama *et al.* 2007) et chez la souris avec du DSS à 5% (Kwon *et al.* 2005b) ou à 3% (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010).

L'administration du DSS induit également une augmentation d'expression de l'iNOS associée à une augmentation du taux de [•]NO. Celle-ci a été mesurée dans le côlon de rats lors de l'administration de DSS à 3% (Arafa *et al.* 2009) et à 5% (Larrosa *et al.* 2009). Ceci se retrouve également dans le plasma chez la souris recevant le DSS à 3% (Krieglstein *et al.* 2001; Oh *et al.* 2006). Ces derniers auteurs ont également détecté une augmentation de l'activité de l'iNOS dans la muqueuse colique (Oh *et al.* 2006).

e.4. Marqueurs du stress oxydant

Les effets des espèces radicalaires associés à l'inflammation intestinale et précédemment décrits sont également observés dans le modèle DSS.

La principale altération oxydative mesurée dans ce modèle est la peroxydation lipidique et de nombreux auteurs décrivent une augmentation des taux de MDA chez le rat recevant le DSS à 5% (Carrier *et al.* 2002; Pelissier *et al.* 2006; Damiani *et al.* 2007; Larrosa *et al.* 2009) ou à 3% (Arafa *et al.* 2009). La peroxydation lipidique est également observée chez la souris avec le DSS à 5% (Xu *et al.* 2009; Yao *et al.* 2010).

D'autres altérations oxydatives sont également détectées. C'est le cas des groupements carbonyles issus de l'oxydation des protéines dont la concentration augmente lors de l'inflammation colique induite par la consommation de DSS à 5% chez le rat (Mercier *et al.* 2002; Pelissier *et al.* 2006).

L'oxydation de l'ADN se manifestant par l'augmentation du taux de 8-OH-dG dans les urines (Baba *et al.* 2009) ou par l'augmentation des altérations oxydatives de l'ADN mesurées par le test des comètes (Jin *et al.* 2008) est également augmentée lors de l'administration de DSS à 4 ou 1% chez le rat.

L'effet du DSS se caractérise également par une altération des systèmes de défense antioxydants. Une diminution du taux de GSH dans la muqueuse colique de rats recevant le DSS (3 à 5%) a été décrite (Camuesco *et al.* 2006; Larrosa *et al.* 2009; Marquez *et al.*

2010). De plus, le DSS induit une diminution d'activité des enzymes antioxydantes. Ceci a été décrit pour la SOD chez la souris recevant le DSS à 3% (Oh *et al.* 2006) ou à 5% (Yao *et al.* 2010) ainsi que chez le rat avec une concentration de DSS de 5% (Korkina *et al.* 2003). La diminution d'activité de la SOD est associée à une diminution d'activité de la CAT (Korkina *et al.* 2003; Oh *et al.* 2006) et de la GPx (Oh *et al.* 2006; Yao *et al.* 2010).

e.5. Autres marqueurs

L'administration de DSS a également un impact sur les concentrations plasmatiques de protéines de la phase aiguë de l'inflammation et augmente ainsi les concentrations en α 2-MG, α 1-AGT, haptoglobine, SAA et fibrinogène. Il semblerait que ces augmentations soient consécutives à la production de cytokines puisque leur expression est stimulée par les IL-1 like et les IL-6 like (Moshage 1997; Mercier *et al.* 2002; Larrosa *et al.* 2009). De plus, le DSS stimule également l'activité des cyclo-oxygénases ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en prostaglandines notamment en PGE₂ (Larrosa *et al.* 2009).

II. Les polyphénols, des micronutriments aux effets préventifs

A. Généralités sur les polyphénols

1. Diversité structurale et sources alimentaires des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (Kühnau 1976). Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. On distingue les acides phénoliques (C_6-C_1 et C_6-C_3), les flavonoïdes ($C_6-C_3-C_6$), les lignanes ($C_6-C_3-C_3-C_6$) et les stilbènes ($C_6-C_2-C_6$). (**Figure 24**). Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces. Ainsi, la concentration en polyphénols totaux peut varier de 140 mg/kg de poids frais (PF) pour la pomme de terre à 5,5 g/kg PF pour la cerise (Scalbert *et al.* 2000).

Dans cette partie, nous présenterons les structures ainsi que les principales sources alimentaires des différentes classes de polyphénols.

a. Les acides phénoliques

On distingue deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxybenzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxycinnamiques.

a.1. Les acides hydroxybenzoïques

Présents dans peu de végétaux de l'alimentation courante, ils sont peu étudiés. Ils ont une formule de base de type C₆-C₁ (**Figure 25**). Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4) donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïque, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (Tomas-Barberan *et al.* 2000a). Ils sont le plus fréquemment présents dans les fruits et légumes sous forme de conjugués (esters ou glycosides), cependant l'acide gallique peut être retrouvé sous forme libre dans certains fruits comme le kaki. La réaction d'estérification d'un de ces acides avec une molécule de glucose donnera des structures plus complexes appelées tanins hydrolysables (Clifford *et al.* 2000) comme les gallotanins retrouvés dans la mangue ou les ellagitannins dans certains fruits rouges comme les fraises, les framboises et les mûres où leur concentration peut atteindre 270 mg/kg PF. Les acides hydroxybenzoïques sont également présents dans les plantes aromatiques et les épices (23 à 27 mg/kg dans l'écorce de cannelle). L'acide gallique est fortement présent dans le clou de girofle (175 mg/kg), le glucoside d'acide 4-hydroxybenzoïque dans l'anis (730 à 1080 mg/kg), l'aneth ou encore le persil. Ces composés sont modifiés lors des procédés de fabrication de certains aliments et les conjugués sont alors en partie hydrolysés (Tomas-Barberan *et al.* 2000a).

a.2. Les acides hydroxycinnamiques

Très répandus dans le règne végétal, ces composés ont une formule de base de type C₆-C₃ (**Figure 26**) et leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique (Clifford 2000b). Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits (D'Archivio *et al.* 2007). Les acides férulique, sinapique et 4-coumarique sont également répandus dans les aliments (Clifford 2000b). Les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous formes conjuguées. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach *et al.* 2004; Macheix *et al.* 2006). Le conjugué le plus commun est l'acide 5-cafféoylquinique également appelé acide chlorogénique (70 à 350 mg dans une tasse de café) qui représente jusqu'à 90% des polyphénols de la pomme de terre (Clifford 1999). Les acides hydroxycinnamiques sont présents dans les fruits comme les myrtilles, le

kiwi, les prunes, les fraises ou les pommes (de 0,5 à 2 g/kg PF). L'acide férulique est, quant à lui, le plus abondant dans les céréales (0,8 à 2 g/kg de poids sec dans les grains de blé) mais également dans certains légumes comme l'aubergine (600 à 660 mg/kg PF) (D'Archivio *et al.* 2007). L'acide 4-coumarique est présent en quantité importante dans les épinards (300 à 350 mg/kg PF) (Clifford 2000b).

b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio *et al.* 2007). Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits. Ils présentent une structure commune en C₆-C₃-C₆ (**Figure 27**). Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) (Macheix *et al.* 2006). Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols et les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier *et al.* 2009).

Il existe dans chaque sous-classe de nombreux composés selon les substitutions des cycles aromatiques. La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau (Crozier *et al.* 2009).

b.1. Les 4-oxoflavonoïdes

- Les flavones

Les flavones présentent une double liaison en position 2-3 et le noyau aromatique B est fixé en position 2 (**Figure 28**). De manière générale, les flavones sont présentes sous forme de 7-O-glycosides. Moins répandues dans les fruits et légumes que les flavonols, les flavones sont principalement présentes sous forme de glycosides de lutéoline et d'apigénine. Les sources principales de flavones sont le persil (240 à 1850 mg/kg PF) et le céleri (20 à 140 mg d'apigénine /kg PF) ou de manière plus modérée le poivron rouge (5 à 10 mg/kg PF). Les glycosides de flavones sont également présents dans les céréales comme le mil ou le blé (Manach *et al.* 2004). Sous forme glucuronidée, la lutéoline 7-diglucuronide est présente dans l'infusé de verveine odorante (environ 100 mg/l) (Carnat *et al.* 1999). Enfin, la peau des agrumes contient des flavones polyméthoxylées comme la tangérétine, la

nobilétine ou la sinensétine. Particulièrement hydrophobes, ces dernières sont également présentes dans des huiles essentielles : plus de 6,5 g/l dans l'huile essentielle de mandarine (Shahidi *et al.* 1995).

- Les flavonols

Caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C₃ (**Figure 29**), ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal à l'exception des algues et des champignons. Les composés principaux sont le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnétine et la myricétine. Ils sont le plus souvent présents sous forme de glycosides, avec une molécule de glucose ou de rhamnose. Leur conjugaison se fait le plus fréquemment en position 5, 7, 4', 3' et 5' et on a pu mettre en évidence plus de 200 conjugués *O*-glycosylés différents pour le seul kaempférol (Crozier *et al.* 2009). S'ils sont largement présents dans les végétaux, leurs concentrations moyennes restent cependant limitées : entre 15 et 30 mg/kg PF. Avec une concentration de 1,2 g/kg PF, l'oignon est l'aliment le plus riche en flavonols. Les autres sources sont moins riches : 300 à 600 mg/kg PF de quercétine dans le chou frisé, 30 à 225 mg/kg PF de kaempférol dans le poireau, 30 à 160 mg/kg PF de myricétine dans la myrtille. Ils sont également présents dans des boissons comme le vin rouge (2 à 30 mg/l), le thé noir (30 à 45 mg/l) et le thé vert (20 à 35 mg/l) (Manach *et al.* 2004). On compte jusqu'à 5 à 10 molécules différentes dans un même végétal. Leur biosynthèse étant stimulée par la lumière, ils s'accumulent dans les parties extérieures et aériennes des végétaux (peau et feuilles). Ainsi, il existe des différences de concentration au sein d'une même plante ou d'un même fruit selon l'exposition à la lumière du soleil (Price *et al.* 1995).

- Les flavanones

Les flavanones se caractérisent par la saturation de l'hétérocycle C (**Figure 30**). Le plus souvent glycosylées par un disaccharide en C₇, on distingue deux sous-familles : les rutinosides (6-*O*- α -L-rhamnosyl-D-glucosides) et les néohespéridosides (2-*O*- α -L-rhamnosyl-D-glucosides) (D'Archivio *et al.* 2007). Cette classe de flavonoïdes est caractéristique des agrumes. Ainsi, on retrouve principalement des rutinosides de flavanones dans les citrons, les mandarines, les oranges. Les pamplemousses et les oranges amères renferment principalement des néohespéridosides, respectivement la naringine et la néohespéridine. Alors que les néohespéridosides confèrent un goût amer comme la naringine dans le pamplemousse, les rutinosides (narirutine, hespéridine...) donnent une

saveur moins prononcée. La distribution des flavanones dans les fruits est hétérogène et elles sont plus particulièrement concentrées dans les parties solides du fruit. Le jus de pamplemousse contient entre 295 et 377 mg/l de naringine tandis que l'albedo en contient entre 13 et 16 g/kg. Le jus d'orange renferme 200 à 600 mg/l d'hespéridine ainsi que 15 à 85 mg/l de narirutine. Ainsi on retrouvera de 40 à 140 mg de glycosides de flavanones dans un verre de jus d'orange alors que le fruit seul en renferme jusqu'à 5 fois plus de par la richesse de ses structures solides (Tomas-Barberan *et al.* 2000b). Les flavanones sont également présentes à plus faible concentration dans la tomate ou certaines plantes aromatiques comme la menthe.

- Les isoflavones

Les isoflavones se différencient des flavones par la fixation du noyau benzénique B au carbone 3 de l'hétérocycle. Elles présentent de fortes similitudes avec les œstrogènes. En effet, la présence de groupements hydroxyles en C₇ et C_{4'} leur donne une structure similaire au 17-β-œstradiol leur conférant ainsi des propriétés pseudo-hormonales dont celle de se lier aux récepteurs aux œstrogènes. Ainsi elles sont également nommées phyto-estrogènes. Les isoflavones sont présentes presque exclusivement dans les légumineuses et plus particulièrement dans les Fabacées. Le soja et ses produits dérivés en sont les sources principales dans l'alimentation humaine (Cassidy *et al.* 2000). Trois molécules principales ont été mises en évidence dans le soja : la génistéine, la daidzéine et la glycitéine dans un ratio 1/1/0,2. Elles peuvent être présentes sous 4 formes différentes : aglycones, 7-*O*-glycosides, 6''-*O*-acétyl-7-*O*-glucoside et 6''-*O*-malonyl-7-*O*-glucoside, cette dernière pouvant donner aux aliments un goût désagréable d'amertume et d'astringence (Coward *et al.* 1998). Les concentrations en isoflavones sont très variables dans les aliments issus du soja. Leur concentration est de 570 à 3800 mg/kg dans les graines, de 830 à 1800 mg/kg dans la farine et de 35 à 175 mg/l dans le lait de soja. Elles sont retrouvées en grande quantité dans les produits fermentés comme le miso (250 à 890 mg/kg), le tofu (80 à 675 mg/kg) ou encore le tempeh (450 à 530 mg/kg) (pâte fermentée entrant dans l'alimentation indonésienne). Le processus de fermentation hydrolysant les glycosides, ces composés seront principalement retrouvés sous formes d'aglycones stables dans ces aliments (Cassidy *et al.* 2000).

b.2. Les chalcones et dihydrochalcones

Les chalcones dérivent des flavanones par isomérisation réversible en milieu alcalin, ce qui se traduit par l'ouverture de l'hétérocycle C avec formation d'une double liaison en position C₂-C₃ (**Figure 31**). Les chalcones sont peu présentes dans l'alimentation en raison de leur transformation en flavanones en milieu acide, principalement au cours des étapes d'extraction (Tomas-Barberan *et al.* 2000b). La tomate est la source principale de chalcones, en particulier la naringénine chalcone. Sa concentration dans la peau est de 64 mg/kg et on en détecte uniquement des traces dans le ketchup où la naringénine domine suite aux traitements d'extraction (Krause *et al.* 1992).

Les dihydrochalcones dérivent des chalcones par réduction de la double liaison entre les carbones 2 et 3. Elles sont caractéristiques de la pomme et de ses produits dérivés (cidre, jus...). On retrouve dans ces aliments 3 molécules principales : la phloridzine (phlorétine 2'-glucoside), la phlorétine 2'(2''-xylosyl-glucoside) et la 3-hydroxyphloridzine (Lu *et al.* 1997). Dans la pomme, les dihydrochalcones sont présentes dans la peau et la chair et plus spécifiquement dans les pépins où elles représentent plus de 60% des polyphénols totaux alors qu'elles n'en représentent pas plus de 3% dans l'épiderme ou le parenchyme (Guyot *et al.* 1998). Dans les pommes à cidre Kemerrien, la concentration de phloridzine atteint 170 mg/kg avec la répartition suivante : 67 mg dans le trognon, 46 mg dans le parenchyme et 24 mg dans l'épiderme. Le trognon et la peau des pommes n'étant pas consommés la plupart du temps, la consommation de dihydrochalcones reste relativement faible (Burda *et al.* 1990).

b.3. Les flavanols et proanthocyanidines

Les flavanols existent sous forme de monomères également appelés catéchines (**Figure 32**) ainsi que sous forme de polymères, les proanthocyanidines. Les flavanols présentent un hétérocycle C saturé auquel s'ajoute une fonction hydroxyle en C₃. La présence de deux centres chiraux en C₂ et C₃ donne 4 isomères potentiels pour chaque niveau d'hydroxylation du cycle B. Dans les végétaux, les monomères principaux sont la (+)-catéchine et son isomère l'(-)-épicatéchine. Ces monomères peuvent être hydroxylés en C₄ et former la (+)-gallocatéchine et l'(-)-épigallocatéchine. De plus, des conjugaisons par estérification en C₃ avec l'acide gallique formeront des oligomères (épigallocatéchine 3-gallate (EGCG) et épicatéchine 3-gallate).

La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols principaux présents dans de nombreux fruits, tandis que gallocatéchine, épigallocatechine et épigallocatechine gallate sont plus spécialement présents dans le thé. Les sources principales de (épi)catéchine sont l'abricot et la cerise (≈ 250 mg/kg) ; elles sont également retrouvées dans les pêches, les prunes, les fraises, les groseilles, les myrtilles et la rhubarbe. Ces polyphénols présentent la particularité de ne pas être glycosylés contrairement à la plupart des autres flavonoïdes. Ils sont également présents dans le vin rouge (300 mg/l). Cependant le chocolat (600 mg/kg) et le thé vert (800 mg/l) en sont de loin les principales sources (D'Archivio *et al.* 2007). De fortes variations de concentration sont observées selon le stade de développement des fruits. Ainsi, dans les pommes et les poires, le contenu en flavanols diminue rapidement au cours de la croissance (Amiot *et al.* 1995). De plus, ces monomères sont fortement modifiés lors des procédés de transformation. Ainsi les étapes de fermentation et de broyage du thé noir donnent des théaflavines, théacitrines et théarubigines. La quantité de flavanols dans le thé noir est alors significativement plus faible que dans le thé vert qui ne subit quasiment aucune étape de fermentation (Graham 1992).

Les proanthocyanidines (**Figure 33**), encore appelées « tanins condensés » se forment par polymérisation des monomères de flavanols lors de réactions d'auto-oxydation ou le plus souvent sous l'action d'une enzyme, la polyphénoloxydase (Mayer *et al.* 1979). La polymérisation se fait entre les molécules de (+)-catéchine et (-)-épicatéchine par des liaisons C₄-C₈ ou C₄-C₆ pour les proanthocyanidines de type B. Les proanthocyanidines de type A ont en plus une liaison C₂-O-C₇. Ces polymères peuvent contenir jusqu'à plus de 50 unités. Cependant, le degré de polymérisation pour un aliment donné est rarement déterminé et peut, par exemple, aller de 4 à 11 dans les pommes à cidre. Les proanthocyanidines uniquement constituées d'unités (épi)catéchines sont appelés procyanidines et sont les plus répandues. Les proanthocyanidines contenant l'(épi)gallocatéchine sont appelées prodelphinidines et sont plus rares. Les proanthocyanidines participent à la saveur des aliments. Elles sont responsables de l'amertume du chocolat et de l'astringence de certains fruits comme le raisin, les pêches, les kakis ou les pommes par complexation avec les protéines salivaires. Elles sont également présentes dans des boissons comme le vin, le cidre, le thé et la bière (Santos-Buelga *et al.* 2000). Dans les pommes, la concentration en procyanidines est évaluée entre 388 et 1622 mg/kg PF (Gerhauser 2008).

b.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau le plus important. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des tissus auxquels ils donnent des couleurs rose, rouge, bleu et violet (Mazza *et al.* 1993). Plusieurs centaines de molécules sont connues. Elles varient selon le nombre et la position des différents groupements hydroxyles et méthoxyles, la nature, le nombre et la position des sucres et l'acylation éventuelle de ces sucres (Clifford 2000a) (**Figure 34**). Très rarement présents sous forme aglycone (anthocyanidine), les anthocyanes les plus fréquents sont des 3-glycosides ou des 3,5-diglycosides de pélagonidine, cyanidine (anthocyanidine la plus répandue dans l'alimentation), péonidine, delphinidine, pétunidine et malvidine. Leur couleur varie en fonction du pH. Les anthocyanes sont particulièrement instables sous forme d'aglycones mais stabilisés par la glycosylation. Les anthocyanes sont présents dans le vin rouge, certaines céréales, certains légumes feuillus ou racinaires (chou rouge, oignon rouge, radis). Cependant, c'est dans les fruits qu'ils sont les plus abondants (Manach *et al.* 2004). Leur quantité dans l'aliment est souvent proportionnelle à l'intensité de la pigmentation du fruit et leur concentration peut atteindre 2 à 4 g/kg dans certaines baies comme le cassis ou les mûres. Ils sont particulièrement présents dans les fruits rouges comme les myrtilles (0,8 à 4,2 g/kg), les baies de sureau (2 à 10 g/kg) ou les baies d'aronie (5 à 10 g/kg) (Clifford 2000a). Les anthocyanes sont principalement présents dans la peau à l'exception de certains fruits comme la fraise ou la cerise pour lesquels on les retrouve dans la chair. Les vins contiennent de 200 à 350 mg/l d'anthocyanes qui sont transformés en structures complexes lorsque ceux-ci vieillissent (Clifford 2000a; Manach *et al.* 2004).

c. Les lignanes

Les lignanes sont formés par la dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane (**Figure 35**). La source alimentaire la plus riche est la graine de lin qui contient du sécoisolaricirésinol à une concentration de 3,7 g/kg de poids sec ainsi que du matairesinol en plus faible quantité. D'autres céréales (le triticale et le blé), des fruits (les poires et les prunes) et certains légumes (l'ail, les asperges et les carottes) mais aussi des légumineuses comme les lentilles contiennent également des lignanes mais à des concentrations environ 1000 fois plus faibles que dans la graine de lin (Thompson *et al.* 1991; Adlercreutz *et al.* 1997). Les lignanes sont métabolisés par la flore colique libérant de l'entérodol et de l'entérolactone ; ils sont ainsi considérés comme des phytoestrogènes.

Même si leur quantité reste relativement faible dans une alimentation standard, leur ubiquité dans le règne végétal laisse penser qu'ils pourraient constituer une source importante de phytoestrogènes en particulier dans les régimes végétariens.

d. Les stilbènes

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (**Figure 36**). Ils sont synthétisés à partir de dérivés d'acides cinnamiques dont la substitution déterminera celle du cycle B et ainsi la molécule elle-même. Ils sont présents dans la plante sous forme de monomères, dimères, trimères ou polymères. La molécule la plus courante et la plus étudiée est le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) qui existe sous forme cis ou trans. Cependant, la forme trans est majoritaire. Les sources principales de stilbènes sont le raisin et son jus, les cacahuètes et le beurre de cacahuètes. Ils sont également présents en plus faibles quantités dans les baies, le chou rouge, les épinards et certaines plantes médicinales (Crozier *et al.* 2009). La concentration en stilbènes dans le vin est en partie déterminée par les étapes de macération avec la peau et les pépins de raisin. Ainsi, c'est dans le vin rouge que l'on en mesure la plus grande quantité avec une concentration jusqu'à 8 mg/l selon les variétés (Lamuela-Raventos *et al.* 1995). La concentration dans le vin rosé est située entre 1,38 et 2,93 mg/l (Romero-Perez *et al.* 1996) tandis que les vins blancs et pétillants fabriqués à partir du jus seul ne présentent que de faibles concentrations (0,1 à 1,2 mg/l). Le jus de raisin rouge contient 0,7 à 14 mg/l de resvératrol et le jus de raisin blanc environ 1,4 mg/l. Dans les jus, les formes glycosylées représentent plus de 90% du resvératrol (Romero-Perez *et al.* 1996). La concentration dans les cacahuètes va de 1,3 à 3,7 mg/kg (Cassidy *et al.* 2000).

2. Estimation de la consommation journalière en polyphénols

L'estimation d'une consommation journalière moyenne en polyphénols est difficile à établir en raison de la grande diversité de molécules présentes dans les plantes, de leur large distribution dans les aliments et des variations de quantités de polyphénols pour un aliment donné. Cette estimation peut se faire à partir des tables de composition qui donnent la concentration en polyphénols pour un aliment donné. L'ensemble des composés n'étant pas assimilés de façon similaire par l'organisme, une estimation relative de la consommation via

l'utilisation de biomarqueurs est également possible. Cependant, elle reste difficile à mettre en place.

Le développement des tables de composition doit donc prendre en compte la diversité structurale des polyphénols. Le grand nombre de sources alimentaires mais aussi la diversité des méthodes analytiques utilisées compliquent l'élaboration de telles tables. Actuellement le « United States Department of Agriculture » propose trois bases de données sur les sources alimentaires de polyphénols : une portant sur 5 sous-classes de flavonoïdes (flavonols, flavones, flavanones, flavan-3-ols et anthocyanes) dans laquelle sont répertoriés 26 composés dans 200 aliments différents. Une seconde table porte sur les proanthocyanidines et une troisième sur les isoflavones (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>). Cependant, aucune donnée n'est disponible pour les acides phénoliques, les lignanes ou les stilbènes. De plus, les flavonoïdes sont quantifiés sous forme d'aglycones après hydrolyse alors qu'ils sont majoritairement présents sous forme glycosylées dans l'alimentation. Plus récemment, la base de données Phenol-Explorer développée par l'INRA en partenariat avec industriels et partenaires académiques (www.phenolexplorer.com) recense les polyphénols dans l'alimentation de manière beaucoup plus large que ce qui était disponible auparavant et rassemble des données portant sur 502 polyphénols dans 452 aliments (Neveu *et al.* 2010).

Le plus souvent, l'estimation de la consommation en polyphénols est basée sur une publication ancienne de Kühnau (Kühnau 1976) qui évalue cette consommation aux USA à 1 g/j comprenant 460 mg de proanthocyanidines, 200 mg de catéchines, 180 à 215 mg d'anthocyanes et 115 mg de flavones et de flavonols. Ceci est supérieur à la consommation d'autres antioxydants comme la vitamine C (90 mg/j), les caroténoïdes (5 mg/j) ou la vitamine E (12 mg/j). Cependant, et bien que cette estimation soit encore largement utilisée, elle reste incomplète car basée uniquement sur la consommation de flavonoïdes sans prise en compte des acides phénoliques, lignanes ou stilbènes. De plus, le panel alimentaire utilisé pour établir ces valeurs est relativement restreint et ne prend en compte que la consommation de fruits et de boissons comme le thé, le café ou le vin. Récemment, l'estimation de la consommation de polyphénols utilisant la base de données Phenol-Explorer a montré que la consommation moyenne de polyphénols pouvait être estimée à 1,2 g/j (Perez-Jimenez *et al.* 2011). Il apparaît ainsi que malgré l'approximation de l'étude de Kühnau, la valeur de 1 g/j soit toujours d'actualité. Dans les pays occidentaux, les sources

alimentaires principales de flavonoïdes sont le thé, le vin rouge, les fruits, les légumes, le cacao, le chocolat et les légumineuses. La consommation de flavonoïdes totaux est estimée dans ces pays entre 65 et 250 mg/j (Manach *et al.* 2004). Concernant la consommation d'acides phénoliques, celle-ci est également très variable et les valeurs proposées par Clifford vont de 25 à 800 mg/j et peuvent aller jusqu'à 1 g/j (Clifford 2000b). Le **tableau 4** rapporte les estimations de la consommation journalière des différentes classes de flavonoïdes chez des adultes dans différents pays (Erdman *et al.* 2007). De fortes variations peuvent apparaître car la consommation de polyphénols est soumise aux habitudes alimentaires et aux saisons.

3. Métabolisme des polyphénols

Bien que les polyphénols soient des micronutriments très répandus dans notre alimentation, ils ne sont pas nécessairement les plus actifs biologiquement. En effet, ils peuvent être faiblement absorbés au niveau intestinal, hautement métabolisés ou rapidement éliminés. De plus, les métabolites retrouvés dans le sang ou les organes et résultant du métabolisme digestif et hépatique peuvent avoir une activité biologique différente des molécules natives. Ainsi, les connaissances sur le métabolisme et la biodisponibilité des polyphénols sont primordiales à l'évaluation et à la compréhension de leurs effets biologiques. Les connaissances actuelles permettent la mise en place d'un schéma global de l'absorption ainsi que du métabolisme de ces micronutriments (**Figure 37**).

a. Sites d'absorption

Les propriétés biologiques des polyphénols dépendent en partie de leur absorption au travers de la paroi digestive. La structure des molécules va en partie déterminer leur taux d'absorption ainsi que les métabolites qui seront retrouvés dans le plasma ou les urines. La majeure partie des polyphénols consommés n'est pas retrouvée sous forme native dans les urines, ce qui traduit à la fois l'absorption et le métabolisme des composés (D'Archivio *et al.* 2007). Les formes aglycones des polyphénols sont en général rapidement absorbées dans l'estomac et l'intestin grêle. Cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme de glycosides, d'esters ou de polymères qui ne sont pas absorbés sous forme native. Ainsi il a été montré que l'absorption de quercétine et de daidzéine était effective au niveau stomacal mais que leurs glycosides qui résistent au pH acide de l'estomac ne sont pas absorbés à ce niveau (Gee *et al.* 1998).

L'ensemble des flavonoïdes, hormis les flavanols, sont glycosylés le plus souvent par une molécule de glucose ou de rhamnose mais aussi d'arabinose, de xylose ou encore d'acide glucuronique (Harborne, 1994). L'hydrophilie générée par la glycosylation de la plupart des polyphénols ne permet certainement pas une diffusion passive au travers de la membrane plasmique des entérocytes. Une étape de déglycosylation catalysée par une enzyme est donc nécessaire à l'absorption de ces flavonoïdes par les entérocytes. La première voie de déglycosylation fait intervenir un transporteur de glucose sodium-dépendant (SGLT1 : sodium-glucose transport protein 1) qui permet le passage actif des glucosides de polyphénols dans les entérocytes (Hollman *et al.* 1995; Hollman *et al.* 1999). Ce passage est suivi d'une étape d'hydrolyse par une β -glucosidase cytosolique (Day *et al.* 1998). La seconde voie implique une lactase phloridzine hydrolase (LPH), glucosidase présente au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides, dont les formes aglycones peuvent ensuite traverser passivement la membrane plasmique des entérocytes (Day *et al.* 2000). Il semblerait que ces deux mécanismes soient impliqués à des degrés différents dans l'absorption des différents glucosides de polyphénols. En effet, il a été montré que la quercétine 3-glucoside n'était pas un substrat de la β -glucosidase cytosolique et que ce composé empruntait préférentiellement la voie de la LPH, alors que la quercétine 4'-glucoside empruntait les deux voies métaboliques (Day *et al.* 2003; Sesink *et al.* 2003). Les polyphénols glycosylés par d'autres sucres (rhamnose, arabinose, xylose...), les proanthocyanidines ou les esters d'acides phénoliques comme l'acide chlorogénique ne sont pas ou très mal absorbés au niveau de l'intestin grêle (Manach *et al.* 2004). En effet, il a été montré chez l'homme, lors de l'étude de l'absorption de glycosides de quercétine, que le pic d'absorption d'un glucoside (quercétine 4'-glucoside) se faisait 0,5 à 0,7 h après ingestion tandis que celui du rutoside (quercétine 3-rutinoside) se faisait 6 à 9 h après ingestion. La différence d'efficacité d'absorption de ces glycosides a été confirmée par le fait que la biodisponibilité du rutoside correspondait à 15 à 20% seulement de celle de la quercétine 4'-glucoside (Hollman *et al.* 1999; Graefe *et al.* 2001).

Ainsi les polyphénols qui ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle gagnent le côlon où la microflore hydrolyse les glycosides en aglycones grâce à l'action d'enzymes (rhamnosidases, estérases...). Les aglycones libérés sont en partie absorbés au niveau du côlon mais de manière nettement moins efficace que dans l'intestin grêle où la surface d'échange est plus grande et le nombre de transporteurs plus conséquent (Manach *et al.*

2004). Les aglycones non absorbés sont ensuite métabolisés par la flore colique en acides aromatiques plus simples par ouverture de l'hétérocycle. Ces réactions libèrent diverses molécules dont des acides hydroxyphénylacétiques issus du métabolisme des flavonols, des acides hydroxyphénylpropioniques issus du métabolisme des flavones et des flavanones ainsi que des phénylentérolactones et des acides hydroxyphénylpropioniques issus du métabolisme des flavanols. Ces acides aromatiques sont par la suite eux-mêmes métabolisés en dérivés d'acide benzoïque (Manach *et al.* 2004). Ces différentes molécules peuvent être absorbées au niveau du côlon (Rechner *et al.* 2002).

b. Conjugaison des polyphénols

Suite à leur absorption, les polyphénols vont subir trois types de conjugaison : méthylation, glucuronidation et sulfatation au niveau de l'intestin grêle puis du foie. Ces étapes de conjugaison sont catalysées par des enzymes de phase II. La catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT) catalyse le transfert d'un groupement méthyl depuis la S-adénosyl-méthionine sur les polyphénols portant un groupement catéchol (catéchine, quercétine ...) le plus souvent en position 3' du noyau B et minoritairement en position 4'. Cette enzyme est présente dans une large gamme de tissus, mais son activité est la plus élevée dans le foie et les reins (Tilgmann *et al.* 1996; Piskula *et al.* 1998). La sulfotransférase catalyse le transfert d'un groupement sulfate depuis la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate sur les fonctions hydroxyles de substrats variés dont les polyphénols. Cette réaction de sulfatation se fait principalement dans le foie (Falany 1997). L'UDP-glucuronosyltransférase (UDP-GT) est une enzyme liée aux membranes du réticulum endoplasmique. Elle catalyse le transfert d'un acide glucuronique de l'acide UDP-glucuronique vers les polyphénols (Spencer *et al.* 1999). La détection de métabolites glucuronidés dans le sang des veines porte et mésentérique après perfusion de polyphénols dans l'intestin grêle de rat montre que la glucuronidation se fait d'abord dans les entérocytes (Sfakianos *et al.* 1997; Spencer *et al.* 1999; Crespy *et al.* 2001). Pour la plupart des flavonoïdes, une partie des glucuronides formés est excrétée dans la lumière intestinale réduisant ainsi leur absorption nette (Crespy *et al.* 1999). Il semblerait que la protéine de résistance multiple MRP-2 ainsi que la *P*-glycoprotéine puisse être impliquées dans cet efflux (Walle *et al.* 1999; Ayrton *et al.* 2001). La proportion de glucuronides sécrétés dans la lumière intestinale dépend principalement de la structure des polyphénols. Ce phénomène ne se produit pas avec la catéchine et l'acide férulique, ce n'est donc pas un système d'élimination pour tous les polyphénols (Donovan *et al.* 2001; Adam *et*

al. 2002). Les conjugués produits au niveau des entérocytes gagnent le foie via la veine porte où ils seront métabolisés par méthylation et/ou sulfatation, cette dernière réaction étant fréquemment précédée d'une étape de déglucuronidation (O'Leary *et al.* 2003). Selon la nature des polyphénols et la quantité ingérée, la proportion de chacune des trois réactions de conjugaison est variable. La voie de la sulfatation présente une forte affinité pour ses substrats mais une faible capacité d'action comparativement à la voie de la glucuronidation, ainsi lorsque la quantité de polyphénols ingérée est élevée, la proportion de glucuronidation sera augmentée (Koster *et al.* 1981). Le taux de conjugaison des polyphénols étant particulièrement élevé, la part d'aglycones mesurée dans le plasma est, par conséquent, particulièrement faible.

4. Biodisponibilité des polyphénols

a. Métabolites circulants

Considérant la forte capacité de conjugaison des polyphénols au niveau intestinal et hépatique, les aglycones sont le plus souvent absents dans le plasma après consommation de polyphénols à doses nutritionnelles (Manach *et al.* 2004). Les polyphénols glycosylés ou estérifiés natifs ne sont en général pas retrouvés dans le sang et les produits identifiés sont des métabolites sulfatés, glucuronidés et/ou méthylés issus du métabolisme intestinal et hépatique, les glucuronides constituant les principales formes circulantes (Manach *et al.* 2006). Toutefois, les anthocyanes constituent une exception à cette généralité dans la mesure où les formes glycosylées natives sont majoritaires au niveau circulant (Cao *et al.* 2001).

Dans le plasma, les métabolites des polyphénols sont liés aux protéines plasmatiques et en particulier à l'albumine, avec cependant des variations d'affinité selon les molécules (Boulton *et al.* 1998). En effet, il a été montré avec le rutoside et l'isoquercétine, qu'une hydroxylation en C₃ affaiblissait la liaison à l'albumine (Dangles *et al.* 1999). L'effet de la glucuronidation et de la sulfatation sur la liaison des polyphénols à l'albumine est moins bien connu. Les polyphénols liés à l'albumine conservent leur capacité antioxydante (Dangles *et al.* 1999). Le degré de liaison à l'albumine a un impact sur la clairance des métabolites ainsi que sur leur délivrance aux cellules et tissus (Manach *et al.* 2004). Malgré l'augmentation de l'hydrophilie due à la liaison à l'albumine, l'interaction des polyphénols avec la membrane plasmique se fait via la mise en place de liaisons hydrogènes entre les

groupements hydroxyles de la molécule et les têtes polaires des phospholipides à pH physiologique (Verstraeten *et al.* 2003). Ainsi, il semblerait que les polyphénols conservent, malgré leur liaison à l'albumine, leur capacité de liaison aux cellules.

b. Concentrations plasmatiques

Les concentrations plasmatiques des polyphénols varient selon la nature des molécules consommées ainsi qu'en fonction des sources alimentaires. Ainsi la concentration plasmatique en quercétine, après consommation de 80 à 100 mg d'équivalents aglycone à partir de pommes, d'oignons ou d'un repas riche en produits végétaux, peut aller de 0,3 à 0,75 μM (Hollman *et al.* 1997; Manach *et al.* 1998; Graefe *et al.* 2001). La concentration en catéchine et épicatechine va de 0,1 à 0,7 μM après consommation de 90 à 150 mg d'équivalents catéchine dans le thé vert (Lee *et al.* 1995; Unno *et al.* 1996), de 0,25 à 0,7 μM après consommation de 70 à 165 mg d'équivalents catéchine dans le cacao (Rein *et al.* 2000a; Wang *et al.* 2000) ou de 0,09 μM après consommation de 35 mg d'équivalents catéchine dans le vin rouge (Donovan *et al.* 1999). La naringénine est bien absorbée puisqu'elle atteint la concentration plasmatique de 6 μM après ingestion de 200 mg d'équivalents aglycone dans le jus de pamplemousse (Erlund *et al.* 2001). La concentration plasmatique en anthocyanes est faible puisque dans les 2 h suivant l'ingestion de 110 à 200 mg d'anthocyanes, seules quelques dizaines de nmol/l sont détectées dans le plasma (Miyazawa *et al.* 1999; Cao *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2001). Les isoflavones sont les composés les mieux absorbés puisque leur concentration plasmatique peut atteindre 1,4 à 4 μM après ingestion d'environ 50 mg d'isoflavones de soja (King *et al.* 1998; Watanabe *et al.* 1998).

c. Distribution dans les tissus et organes

Les polyphénols ingérés peuvent pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie. En effet, des études menées avec des polyphénols marqués (quercétine, épigallocatechine, quercétine 4'-glucoside, resvératrol, cyanidine 3-glucoside) ont montré que, 1 à 6 heures après l'ingestion, la radioactivité était principalement détectée dans le sang et les organes du système digestif. Toutefois, les polyphénols ont également été détectés dans des organes tels que le cerveau, le cœur, les reins, le thymus, le pancréas, la prostate... Les concentrations en polyphénols dans ces tissus étaient de 30 à 3000 ng d'équivalents aglycones/g de tissu selon le

polyphénol considéré, la dose administrée et le tissu analysé (Manach *et al.* 2004; Felgines *et al.* 2009).

d. Voies d'élimination

Les polyphénols sont principalement excrétés par les voies biliaire et urinaire. L'implication de chacune de ces voies dépend principalement de la structure des molécules. Ainsi, les métabolites hautement conjugués seront principalement éliminés dans la bile tandis que les petits conjugués comme les monosulfates seront préférentiellement éliminés par voie urinaire (Crespy *et al.* 2003). La voie biliaire est particulièrement impliquée dans l'élimination de polyphénols comme la génistéine, l'épigallocatechine gallate ainsi que l'ériodictyol (Sfakianos *et al.* 1997; Kohri *et al.* 2001). Les métabolites sont déversés via la bile dans le duodénum et peuvent ensuite être hydrolysés par les β -glucuronidases de la flore colique libérant ainsi les formes aglycones qui peuvent être réabsorbées au niveau de la muqueuse colique établissant ainsi un cycle entérohépatique (Manach *et al.* 2004). La quantité de métabolites excrétés dans les urines est corrélée à la concentration plasmatique maximale des polyphénols. L'excrétion urinaire varie d'une molécule à l'autre et peut aller de 0,3 à 43 % de la dose ingérée (pour 50 mg d'aglycone). Cette excrétion est faible pour les anthocyanes, les flavanols et les flavonols et particulièrement élevée pour les acides phénoliques et les isoflavones (Manach *et al.* 2005; Galvano *et al.* 2007).

B. Polyphénols et santé

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (cancers, ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental. De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols au cours de ces pathologies.

1. Propriétés antioxydantes

Les altérations oxydatives de molécules telles que les lipides, les protéines ou l'ADN sont impliquées dans de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, les phénomènes inflammatoires, le diabète. Un antioxydant biologique se définit comme une substance qui, lorsqu'elle est « présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe

significativement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell 1990). L'effet antioxydant des fruits et légumes est dû en partie à des micronutriments tels que les polyphénols, les vitamines C et E, les caroténoïdes... (Rice-Evans *et al.* 1995). Cet effet antioxydant avait en partie été suggéré dans les années 90 à la suite d'études épidémiologiques montrant une corrélation inverse entre la prévalence des maladies coronariennes dues à une consommation élevée d'acides gras saturés et un régime méditerranéen associé à une consommation élevée de vin rouge, ce qui avait été appelé le « French paradox » (Renaud *et al.* 1992).

a. Caractéristiques chimiques

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libre, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres (Shahidi *et al.* 2003).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique (**Tableau 5**). Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative. De plus, une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus (Dziedzic *et al.* 1983). L'hydroxylation du noyau B joue donc un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Shahidi *et al.* 2003) tandis que l'hydroxylation en 5 et 7 sur le cycle A a peu d'influence. La glycosylation en 3 des flavonoïdes par des mono- ou disaccharides réduit leur activité antioxydante comparativement à leurs aglycones (ainsi le rutoside est moins actif que la quercétine). Il a été montré que les chalcones, et en particulier les 3,4-dihydroxychalcones étaient particulièrement efficaces, notamment en comparaison avec leurs flavanones respectives. Par ailleurs, pour les isoflavones, l'hydroxylation en 4' et en 5 est indispensable à une activité antioxydante significative comme dans le cas de la génistéine. De la même manière, l'activité antioxydante des acides phénoliques dépend de leur degré d'hydroxylation. De plus, il a été montré que les acides hydroxycinnamiques étaient plus antioxydants que les acides benzoïques correspondants (Shahidi *et al.* 2003).

b. Mesure de l'activité antioxydante des polyphénols

L'activité antioxydante des polyphénols se détermine *in vitro* par mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres et de réduction de certains composés chimiques. Les données obtenues sont comparées à des composés de référence comme le Trolox (dérivé hydrosoluble de la vitamine E), l'acide gallique ou la catéchine.

Divers oxydants peuvent être utilisés pour cette détermination :

- l'ABTS^{o+} formé à partir de l'ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) en présence de metmyoglobine et de peroxyde d'hydrogène. Il est utilisé dans la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Rice-Evans *et al.* 1994).

- les radicaux formés par le chauffage de l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) dans la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao, 1998) ou TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ghiselli *et al.* 1995).

- l'ion ferrique Fe³⁺ dans la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) (Benzie *et al.* 1996).

- les radicaux formés par l'auto-oxydation de l'acide linoléique (Velioglu *et al.* 1998).

Cependant, les mesures de l'activité antioxydante des polyphénols isolés ou extraits de végétaux ont une portée limitée et sont difficilement extrapolables pour évaluer l'effet antioxydant des molécules après ingestion, ces composés étant transformés lors de leur séjour dans l'organisme. De plus, les résultats peuvent différer d'un test à un autre pour une même molécule. Ainsi, aucune corrélation n'a été mise en évidence lors de la mesure de l'activité de 13 polyphénols par les méthodes ORAC et TEAC (Rice-Evans *et al.* 1995; Guo *et al.* 1997).

L'effet des polyphénols sur la protection antioxydante des tissus est influencé par leur biodisponibilité qui varie considérablement d'une molécule à une autre. L'ensemble des phénomènes de conjugaison que peuvent subir les polyphénols induit une modification de leur capacité antioxydante (Manach *et al.* 1998). La conjugaison des groupements catéchols permet la prévention de leur oxydation en quinones toxiques potentiellement génératrices de radical superoxide. Ainsi, les polyphénols de type catéchol offrant la meilleure activité

antioxydante sont également potentiellement les plus toxiques (Scalbert *et al.* 2005). Les propriétés antioxydantes des polyphénols dépendent également de leur environnement physicochimique qui varie selon les conditions physiologiques et les tissus considérés. Une influence majeure des protéines plasmatiques comme l'albumine ainsi que des autres antioxydants présents a été mise en évidence (Dangles *et al.* 2001; Laranjinha 2001). Ainsi, les propriétés bénéfiques des polyphénols sur la santé ne peuvent pas être expliquées seulement par leur potentiel antioxydant mesuré *in vitro* et les tests de capacité antioxydante de ces molécules ou d'extraits végétaux ont une faible valeur prédictive de leur effet *in vivo*.

Des dosages de types ORAC et FRAP ont montré que l'ingestion d'aliments ou de boissons riches en polyphénols induisait une augmentation quasiment systématique du pouvoir antioxydant du plasma. Ceci a été observé lors de la consommation de thé (Serafini *et al.* 1996; Leenen *et al.* 2000), de vin (Cao *et al.* 1998; Serafini *et al.* 1998), de bière (Ghiselli *et al.* 2000) ou encore de fruits et légumes comme les fraises ou les épinards (Cao *et al.* 1998).

Cependant, l'implication des polyphénols dans cette augmentation du pouvoir antioxydant du plasma est discutée. En effet, les polyphénols sont présents dans le plasma à de très faibles concentrations et ne pourraient être impliqués que dans 2 à 4% de cette augmentation (Stevenson *et al.* 2007). Une récente étude mesurant l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma suite à la consommation de pommes a montré que 37% de celle-ci était due à l'augmentation de la concentration en urate suite au métabolisme du fructose et qu'aucun effet significatif des polyphénols n'avait été mesuré (Lotito *et al.* 2004). Ces mêmes auteurs ont d'ailleurs proposé récemment que ce phénomène s'appliquait de façon générale aux autres aliments à « forte capacité antioxydante » (Lotito *et al.* 2006). De plus, des incertitudes persistent quant à leur mode d'action précis et à leur efficacité de protection de certains composés cellulaires comme les lipides ou l'ADN lors de stress oxydant et les études portant sur ce sujet sont parfois contradictoires. Ainsi, certains auteurs ont montré une diminution de la peroxydation lipidique dans le plasma après consommation de polyphénols : l'ingestion de catéchines du thé (250 mg) diminue les peroxydes de phospholipides (Nakagawa *et al.* 1999) chez des volontaires sains. De la même manière, une diminution de la concentration de MDA dans le plasma a également été observée chez des volontaires sains après consommation de cassis et de jus de pomme (1,5 l/j pendant 7 j) (Young *et al.* 1999). A l'inverse, la consommation de vin rouge (200 ml/j pendant 10 j) n'a

pas d'effet sur le MDA plasmatique (Sharpe *et al.* 1995). L'effet protecteur des polyphénols sur l'ADN a également été évalué *in vitro* et les résultats montrent selon les cas des effets protecteurs ou délétères. En présence de métaux de transition (Cu^{2+} , Fe^{3+}), les polyphénols induisent leur réduction. Une fois réduits, ces métaux catalysent la formation de radicaux hydroxyles pouvant provoquer des cassures de l'ADN. Ce phénomène pouvant être considéré comme toxique est actuellement une voie de recherche dans les traitements anti-cancéreux et il a été montré que cet effet de polyphénols comme le resvératrol visait préférentiellement les cellules tumorales où la concentration en cuivre est particulièrement élevée, induisant ainsi des effets apoptotiques (Hadi *et al.* 2010). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence des effets protecteurs des polyphénols vis-à-vis de la dégradation de l'ADN. Ainsi chez le rat, les polyphénols du vin induisent une protection de l'ADN hépatique contre des atteintes oxydatives (Casalini *et al.* 1999). Des effets similaires ont été mis en évidence avec l'acide ellagique mais pas avec l'épigallocatechine-gallate (Takagi *et al.* 1995). Chez l'homme, la consommation d'antioxydants ou de fruits et légumes a également été associée à une réduction des atteintes oxydatives à l'ADN de lymphocytes et du taux de 8-OHdG dans les urines (Lampe 1999; Boyle *et al.* 2000). Cependant, d'autres auteurs n'ont observé aucun effet sur l'ADN lymphocytaire avec un régime similaire chez le sujet sain (Beatty *et al.* 2000), ni aucun effet sur le taux de 8-OHdG dans les urines après consommation d'extraits de thé vert (Young *et al.* 2002).

2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre la consommation de polyphénols ou d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement de maladies cardiovasculaires. Ainsi une méta-analyse basée sur 7 études cas-témoins et 10 études en cohortes suggère une réduction du risque d'infarctus du myocarde de 11% lors de la consommation de trois tasses de thé par jour (Peters *et al.* 2001). Ces effets protecteurs du thé ont été confirmés par diverses études (Mukamal *et al.* 2002; Mennen *et al.* 2004). La consommation de vin a également été associée à une réduction du risque de pathologie cardiovasculaire. Une méta-analyse basée sur 26 études en cohortes et cas-témoins a montré qu'une consommation modérée de vin et de bière pouvait être associée à une réduction du risque vasculaire avec des effets plus prononcés pour le vin qui est plus riche en polyphénols (Di Castelnuovo *et al.* 2002). Le vin rouge, dont la part en polyphénols est 10 fois plus élevée que celle du vin blanc, aurait un effet protecteur plus prononcé que le vin blanc, la bière ou les spiritueux (Klatsky *et al.* 2003). Parmi 18 études

prospectives, 10 ont montré une association inverse entre l'ingestion de flavonols, flavones, catéchines, lignanes et le risque de maladie coronarienne et d'accident vasculaire cérébral (AVC), les 8 autres ne montrant pas d'association (Arts *et al.* 2005). Une étude transversale aux USA chez des femmes ménopausées consommant de grandes quantités d'isoflavones a également mis en évidence un risque réduit de maladie cardiaque (de Kleijn *et al.* 2002).

L'utilisation de modèles animaux a permis de préciser en partie l'effet des polyphénols au cours des atteintes cardiovasculaires. Ainsi, la supplémentation de l'eau de boisson avec du vin désalcoolisé, des catéchines, de la quercétine (Hayek *et al.* 1997; Miura *et al.* 2001) ou du jus de grenade (Kaplan *et al.* 2001) a induit une réduction de la taille des lésions athéromateuses dans un modèle d'athérosclérose, la souris déficiente en apolipoprotéine E (apo E^{-/-}). Plus récemment, ces résultats ont été confirmés après supplémentation du régime par des extraits de myrtilles dans ce même modèle (Mauray *et al.* 2009). Des résultats similaires ont été décrits chez le lapin recevant un régime enrichi en cholestérol et traité par des procyanidines de grains de raisin (Yamakoshi *et al.* 1999). Chez la souris apo E^{-/-}, ces effets sont associés à une réduction de l'internalisation des LDL par les macrophages ainsi qu'à une diminution de l'oxydation des LDL isolées, ce qui diminue leur susceptibilité à l'agrégation (Scalbert *et al.* 2005). Chez l'homme, des résultats contradictoires ont été observés. La consommation de boissons et d'aliments riches en polyphénols comme le vin rouge, le cacao, le thé ou le jus de grenade réduirait la susceptibilité des LDL à l'oxydation induite *ex vivo* par le Cu²⁺ (Scalbert *et al.* 2005). Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé ces effets pour le vin rouge ou le chocolat (Scalbert *et al.* 2005). D'autres paramètres comme la lipémie sont modulés lors de l'addition de polyphénols dans l'alimentation. Ainsi, les polyphénols de pépins de raisin ont un effet hypocholestérolémiant chez des rats nourris avec un régime enrichi en cholestérol (Tebib *et al.* 1994). La consommation de flavanones pendant 2 à 6 semaines par des rats normolipémiques ou hyperlipémiques induit une réduction du cholestérol, du LDL-cholestérol et des triglycérides plasmatiques (Bok *et al.* 1999; Lee *et al.* 1999). Chez la souris apoE^{-/-}, les catéchines du thé n'ont pas d'effet sur la concentration lipidique plasmatique, mais diminuent les taux de cholestérol et de triglycérides dans l'aorte (Miura *et al.* 2001). Chez l'homme, la consommation d'une tasse de thé noir ou de 6 tasses de thé vert ou noir pendant 4 semaines n'a pas d'effet sur les concentrations plasmatiques en cholestérol et triglycérides (Scalbert *et al.* 2005). Les polyphénols sont également connus pour avoir des effets antithrombotiques par inhibition de l'agrégation plaquettaire que ce

soit *in vitro* (Sagesaka-Mitane *et al.* 1990; Russo *et al.* 2001) ou *in vivo* chez l'animal (Osman *et al.* 1998; Wollny *et al.* 1999). Ceci a également été observé chez l'homme : dans les 2 à 6 heures après ingestion d'une boisson riche en procyanidines de cacao, l'activation plaquettaire stimulée *ex vivo* par l'épinéphrine ou l'ADP (adénosine diphosphate) est inhibée (Rein *et al.* 2000b). Cependant, d'autres aliments riches en polyphénols (oignon, persil, soja, jus d'agrumes ou thé) n'auraient pas ce type d'effet chez l'Homme (Scalbert *et al.* 2005).

3. Polyphénols et cancer

De nombreux composés phénoliques ont également été décrits comme ayant des activités anti-carcinogènes. Ceci a été montré dans de nombreuses études menées *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses ou *in vivo* à l'aide de modèles animaux. Cependant les données disponibles sur les effets des polyphénols vis-à-vis des cancers chez l'homme sont plus disparates.

L'effet des polyphénols sur les lignées de cellules cancéreuses humaines est fréquemment protecteur et induit une réduction du nombre de tumeurs et de leur croissance (Scalbert *et al.* 2005). Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés : activité œstrogénique ou antiœstrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention de l'oxydation, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire (Garcia-Lafuente *et al.* 2009a).

Les études *in vitro* ont montré que les polyphénols pouvaient agir sur les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de prolifération et de différenciation. Le resvératrol a des effets anti-prolifératifs par l'inhibition des voies de signalisation de kinases MEK1 et ERK ainsi que par la suppression des capacités de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) dans les cellules A431 de carcinome épidermoïde (Garcia-Lafuente *et al.* 2009b). Des effets de l'EGCG sur les voies de signalisation de la croissance par l'inhibition de protéines kinase C ainsi que sur la transcription AP-1 dépendante ont également été décrits (Barthelman *et al.* 1998). De plus un effet inhibiteur de l'EGCG sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B a été observé dans les cellules cancéreuses (Barthelman *et al.* 1998). La modulation de la prolifération cellulaire par les polyphénols passe également par une inhibition de l'angiogenèse. Il a été montré sur les lignées de cellules MDA de cancer mammaire que les flavonoïdes limitaient l'angiogenèse

des tumeurs en inhibant la production du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Ahmad *et al.* 2000). La quercétine a des effets semblables en inhibant l'eNOS et en arrêtant le cycle cellulaire lors de la phase M dans les cellules endothéliales (Schindler *et al.* 2006). Dans les cellules de carcinome prostatique, la quercétine inhibe l'activité des MMP-2 et 9, enzymes impliquées dans la facilitation de l'invasion tumorale et du développement tumoral (Jackson *et al.* 2006). Ces micronutriments peuvent également agir par induction de l'apoptose. Il a été montré que les polyphénols du thé noir (théaflavine et théarubigine) inhibaient la prolifération et stimulaient l'apoptose dans les cellules Du145 de carcinome prostatique en bloquant le passage du cycle cellulaire en phase S induit par la fixation de l'insulin like growth factor (IGF-1) sur son récepteur (Vijayababu *et al.* 2006). Enfin, le traitement de cellules T leucémiques Jurkat par du thé vert à 5%, des extraits de pomme ou de raisin induit une accumulation des protéines ubiquitinyliées associée à une activation des caspases 3 et 7 ainsi qu'à un clivage du système PARP (poly ADP ribose polymérase) de réparation de l'ADN (Sharma *et al.* 2009).

Des effets protecteurs des polyphénols ont également été montrés *in vivo* chez l'animal, en particulier à l'aide de modèles murins (rats et souris). Des extraits riches en anthocyanes de myrtille, de baies d'aronie et de raisin administrés à des rats dont la carcinogenèse colique est induite par l'azoxyméthane (AOM) induisent une diminution de la surface et du nombre de foyers cryptiques (Lala *et al.* 2006). L'application de cyanidine 3-glucoside (C3G), anthocyane majoritaire de la mûre, sur un modèle de papillome épidermoïde chez la souris, induit une diminution du nombre de tumeurs et diminue la largeur de celles-ci (Ding *et al.* 2006). La C3G réduit également la croissance de tumeurs et inhibe le développement de métastases lors de xénogreffes de carcinome pulmonaire humain (Ding *et al.* 2006). Des effets similaires, passant par la modulation de la voie de signalisation des MAP-kinases (mitogen-activated protein) et du facteur de transcription AP-1, ont été montrés dans ce modèle de papillome épidermoïde lors de l'administration orale d'extrait de pelures de pommes (Ding *et al.* 2004). Toujours dans ce modèle, l'application d'un extrait de *Perilla frutescens* riche en lutéoline ou de lutéoline seule réduit également l'incidence et la multiplicité des tumeurs (Ueda *et al.* 2003). Par ailleurs, dans un modèle de fibrosarcome induit chez la souris, la supplémentation du régime alimentaire par 1% de lutéoline réduit son incidence par la diminution des peroxydes lipidiques et du cytochrome p450 (Elangovan *et al.* 1994). Plus récemment, il a également été montré qu'une administration orale d'acide ellagique réduisait l'expression du facteur de

transcription NF- κ B et des enzymes COX-2 et iNOS lors d'une carcinogenèse colique chimiquement induite chez le rat (Umesalma *et al.* 2010). Enfin, la génistéine limite la croissance des tumeurs sensibles aux hormones par ses propriétés œstrogéniques expliquant ainsi en partie les effets protecteurs des isoflavones observés dans les modèles de cancers mammaires et prostatiques (Lamartiniere *et al.* 2002). Ces résultats doivent cependant être considérés avec prudence dans la mesure où les doses utilisées au cours de ces études sont le plus souvent très éloignées de ce qui peut être apporté par l'alimentation.

Les données épidémiologiques et cliniques sur les effets anticarcinogènes des polyphénols sont plus limitées. Une étude épidémiologique menée au Japon a montré qu'une consommation élevée de thé vert (de 3 à plus de 10 tasses par jour) retardait l'apparition de cancers de 8,7 ans chez la femme et de 3 ans chez l'homme (Imai *et al.* 1997). En Italie, une étude de cohorte a montré qu'une consommation élevée d'anthocyanes, de flavones et de flavonols réduisait le risque de cancer colorectal (Rossi *et al.* 2006). La consommation de framboises noires lyophilisées a été associée à une réduction de l'excrétion urinaire d'isoprostane (8-isoPFG2) et 8-OHdG chez des patients atteints du syndrome de Barrett prédisposant au développement de cancer gastrique (Kresty *et al.* 2006). Une relation inverse entre la consommation de flavonols comme la quercétine ou le kaempférol et le risque de cancer du poumon a été observée dans 5 études de cohortes (Knekt *et al.* 1997; Stefani *et al.* 1999; Le Marchand *et al.* 2000; Hirvonen *et al.* 2001; Knekt *et al.* 2002), mais n'avait pas été mise en évidence dans deux autres plus antérieures (Hertog *et al.* 1995; Garcia-Closas *et al.* 1998). Certaines études épidémiologiques n'ont pas pu mettre en évidence un lien entre consommation de polyphénols et réduction du risque de survenue de cancers. L'étude clinique au cours de laquelle 34 hommes de plus de 55 ans ont consommé pendant 6 semaines soit une boisson riche en isoflavones (69 mg/j) soit une boisson pauvre en isoflavones (3 mg/j) n'a pas montré d'impact sur le taux de PSA (prostate-specific antigen), marqueur du cancer de la prostate (Urban *et al.* 2001). L'étude Zutphen menée chez des individus âgés suivis pendant 5 ans a montré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes (oignons, endives, pommes) n'était pas associée à une diminution du risque de survenue de cancer (Hertog *et al.* 1994). Malgré de nombreux effets protecteurs des polyphénols décrits *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, les études épidémiologiques ont parfois des difficultés à confirmer ce qui peut être observé au laboratoire.

4. Polyphénols et pathologies neurodégénératives

Les pathologies liées au vieillissement cérébral (maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson...) sont associées à différents événements cellulaires et moléculaires dont une diminution du fonctionnement mitochondrial, l'apoptose neuronale, le dépôt de protéines agrégées et le stress oxydant (Spencer 2010). Ainsi, différents antioxydants, dont les polyphénols, pourraient jouer un rôle bénéfique vis-à-vis de ces pathologies. De nombreuses études d'intervention alimentaire menées chez l'homme ou chez l'animal avec des aliments ou boissons issus du raisin, du thé ou de baies comme les myrtilles ont montré une amélioration de la mémoire et de la cognition (Rendeiro *et al.* 2009). Il semblerait cependant que les seules propriétés antioxydantes des flavonoïdes contenus dans ces aliments ne soient pas suffisantes pour expliquer leurs effets bénéfiques au niveau cérébral, d'autant que la concentration de composés retrouvés à ce niveau est relativement faible (Spencer 2008a). Il a ainsi été suggéré que les polyphénols puissent agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin ainsi qu'en favorisant la neurogenèse (Spencer 2008b; Spencer 2010). Les polyphénols joueraient également un rôle dans la prévention de différentes pathologies cérébrovasculaires. Il est maintenant admis que démence et diminution du flux sanguin sont associés (Erkinjuntti *et al.* 2009) et il a été mis en évidence au cours d'une étude d'intervention chez l'homme que la consommation d'une boisson riche en flavanols de cacao résultait en une augmentation du flux sanguin cérébral, indispensable à un fonctionnement cérébral optimal (Francis *et al.* 2006). D'autres phénomènes sont impliqués dans ces pathologies comme la dégénérescence et l'inflammation neuronale. La mort des neurones du *locus niger*, impliquée dans la maladie de Parkinson, serait liée à la formation d'une toxine endogène, la 5-S-cystéinyl-dopamine et de son produit d'oxydation, la dihydrobenzothiazine-1. Certains polyphénols, dont des flavonoïdes issus de fruits comme l'orange, la pomme ou le raisin, seraient effectifs pour contrecarrer la formation de cette toxine (Vauzour *et al.* 2008). De plus, certains flavonoïdes de la myrtille inhibent la production de différents facteurs inflammatoires : NO , $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF-}\alpha$ dans les cellules de la microglie (Lau *et al.* 2007). Ainsi l'effet protecteur des polyphénols au niveau cérébral impliquerait divers effets comme la protection des neurones contre les atteintes des neurotoxines ou de l'inflammation, la capacité d'activer la signalisation synaptique ou encore de stimuler le flux sanguin.

5. Polyphénols et diabète

De nombreuses plantes médicinales sont traditionnellement utilisées dans le traitement du diabète et les polyphénols contenus dans certaines de ces plantes seraient à l'origine de leurs effets thérapeutiques (Scalbert *et al.* 2005). L'administration aiguë ou chronique de polyphénols dans des modèles animaux a montré des effets sur la glycémie : les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal ou encore son assimilation dans les tissus périphériques. La consommation d'anthocyanes diacylés induit une hypoglycémie lors de la consommation de maltose chez le rat; cet effet n'est pas retrouvé lors de la consommation de saccharose ou de glucose, suggérant ainsi un effet inhibiteur de l' α -glucosidase par ces anthocyanes (Matsui *et al.* 2002). L'inhibition de l' α -amylase et de la sucrase chez le rat a également été observée après administration de catéchine (Matsumoto *et al.* 1993). L'inhibition des glycosidases intestinales a été étudiée pour de nombreux composés qui induisent une diminution du transport intestinal du glucose par la SGLT1 comme la (épi)catéchine, l'épigallocatechine, le gallate d'épicatéchine, les isoflavones du soja et l'acide chlorogénique (Dembinska-Kiec *et al.* 2008). Plusieurs études *in vitro* ont montré que les polyphénols augmentent l'absorption de glucose par les tissus périphériques. C'est le cas pour l'acide caféique dans les adipocytes d'épididyme de rat ou les myoblastes de souris (Cheng *et al.* 2000; Hsu *et al.* 2000), ainsi que pour des extraits de thé vert et de thé noir (Anderson *et al.* 2002). Cependant, des résultats opposés ont été décrits pour la quercétine et la génistéine qui inhibent l'absorption du glucose lorsque celle-ci est induite par l'insuline dans des adipocytes de rat (Shisheva *et al.* 1992). Les polyphénols peuvent avoir différentes actions sur les tissus périphériques conduisant à une diminution de la glycémie : inhibition de la gluconéogenèse, de la stimulation adrénergique de l'absorption du glucose ou stimulation de la libération de l'insuline par les cellules β du pancréas (Scalbert *et al.* 2005).

Les données portant sur les effets des polyphénols lors de diabète chez l'homme sont moins nombreuses que chez l'animal. Il a été montré que la consommation de 400 ml de café décaféiné n'avait pas d'effet sur la glycémie ou sur l'insulinémie lorsqu'il était ingéré avec du glucose, cependant il diminue la sécrétion du polypeptide insulinothypique glucose-dépendant (GIP) et augmente la sécrétion du glucagon de manière à ce que l'absorption du glucose soit retardée (Johnston *et al.* 2003). Chez des patients atteints de diabète de type II, la consommation de 50 mg/j d'un complément alimentaire contenant des anthocyanes, des flavones et des acides phénoliques d'orange sanguine pendant 2 mois n'a pas d'effet sur la

glycémie (Bonina *et al.* 2002). De la même manière, une consommation de diosmine (1800 mg/j) et d'hespéridine (200 mg/j) par des patients atteints de diabète de type I ne montre pas d'effet sur la glycémie. Cependant, certaines données épidémiologiques laissent penser que les polyphénols pourraient avoir tout de même un effet protecteur puisqu'il a été observé que la consommation de café (riche en acide chlorogénique) était associée à une diminution du risque de diabète de type II (van Dam *et al.* 2002).

6. Polyphénols et ostéoporose

L'ostéoporose est une affection chronique résultant d'une détérioration, liée à l'âge, de l'architecture du tissu osseux et d'une réduction du contenu minéral de l'os qui engendrent une fragilisation du squelette. Cette pathologie hormono-dépendante est particulièrement fréquente chez la femme ménopausée en raison de la déficience en œstrogènes associée (Coxam 2005). Des études menées chez des rates rendues déficientes en œstrogènes par ovariectomie ont montré qu'une supplémentation en isoflavones (génistéine, daidzéine et leurs glycosides) pendant plusieurs semaines prévenait la perte de densité minérale osseuse (Scalbert *et al.* 2005). Le rutoside, administré dans l'alimentation, inhibe la perte osseuse et stimule l'activité ostéoblastique chez la rate ovariectomisée (Horcajada-Molteni *et al.* 2000). Des effets similaires ont été observés lors de la consommation de tyrosol et d'hydroxytyrosol, polyphénols majoritaires de l'huile d'olive (Puel *et al.* 2008) ou de kaempférol (Trivedi *et al.* 2008). De tels effets ont également été observés chez l'Homme. Une forte consommation de soja est associée à une meilleure densité osseuse chez les femmes japonaises (Tsuchida *et al.* 1999) et le suivi d'un régime riche en soja chez les femmes ménopausées a permis de stimuler l'activité ostéoblastique (Chiechi *et al.* 2002). Enfin, une étude de cohorte anglaise suivant des femmes âgées a montré qu'une consommation de thé était associée à une plus forte densité osseuse (Hegarty *et al.* 2000).

7. Polyphénols et autres pathologies

Les polyphénols ont montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies. Le modèle d'encéphalomyélite allergique expérimentale est couramment utilisé pour l'étude de la sclérose en plaque. Il est induit par injection d'adjuvant de Freund et de glycoprotéines de myéline chez la souris, induisant une réaction immunologique Th1/Th17 qui conduit à des dysfonctionnements cérébraux (Gonzalez *et al.* 2011). De nombreux flavonoïdes ont été

testés sur ce modèle : resvératrol, génistéine, silibinine. Le resvératrol agit ici en induisant préférentiellement l'apoptose des cellules T activées mais également des cellules quiescentes en agissant sur les récepteurs AhR (aryl hydrocarbon receptor) aux œstrogènes (Gonzalez *et al.* 2011). Les modèles expérimentaux d'arthrite ont permis de mettre en évidence de nombreux effets protecteurs de polyphénols tels que rutoside, quercétine, resvératrol, hespéridine, catéchines ou dérivés de chalcones (Gonzalez *et al.* 2011). Leurs mécanismes d'action sont encore mal définis, cependant il a été montré que les polyphénols inhibaient la différenciation et la fonction des ostéoclastes/macrophages (Murakami *et al.* 2007; Kauss *et al.* 2008), induisait l'expression de protéases dans les fibroblastes et les chondrocytes de la synovie (Ishiwa *et al.* 2000) ou avaient des effets proapoptotiques sur ces mêmes fibroblastes (Byun *et al.* 2008).

8. Polyphénols et inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (Salas-Salvado *et al.* 2008), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- ) circulantes (Karlsen *et al.* 2007) ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma d   à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN (Nantz *et al.* 2006) (**Tableau 6**).

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique (Bengmark 2004) et la plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'ob  s  t  , du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer (Hotamisligil 2006). Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation (**Tableau 7**) (Gonzalez-

Gallego *et al.* 2010) et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation (Santangelo *et al.* 2007).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de 'NO en modulant l'activité des NOS. Une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de 'NO, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (Kim *et al.* 2004; Guo *et al.* 2009). Des études menées *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes (Gonzalez-Gallego *et al.* 2010). De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Santangelo *et al.* 2007).

Du fait de la faible absorption des polyphénols au niveau de l'intestin grêle, une large partie de ces composés est retrouvée dans la lumière du côlon. Ces composés ainsi que leurs sous-produits issus du métabolisme par la microflore intestinale sont donc en contact direct avec la muqueuse intestinale où ils peuvent agir en tant qu'antioxydants mais également en tant qu'anti-inflammatoires (Del Rio *et al.* 2010).

L'effet protecteur des polyphénols au cours de l'inflammation intestinale est décrit dans le chapitre suivant.

C. Polyphénols et inflammation intestinale

1. Généralités

En raison de la faible absorption des polyphénols au niveau de l'intestin grêle, une large partie de ces composés est retrouvée dans la lumière du côlon et leur concentration à ce niveau peut atteindre plusieurs centaines de μ M. Les polyphénols ainsi que leurs métabolites produits par la microflore intestinale sont donc en contact direct avec la muqueuse colique où ils peuvent agir en tant qu'antioxydants mais également en tant qu'anti-inflammatoires (Del Rio *et al.* 2010). Ainsi, les polyphénols pourraient jouer un rôle

nutritionnel intéressant dans le contrôle de l'inflammation intestinale (Dryden *et al.* 2006). Les études chez l'homme portant sur la consommation de polyphénols au cours des pathologies inflammatoires intestinales sont peu nombreuses. A notre connaissance, une seule étude clinique a montré une diminution du « clinical activity index » après supplémentation en curcumine chez des patients atteints de RCH (Hanai *et al.* 2006). Cependant, de nombreux travaux ont évalué les effets des polyphénols au cours d'études *in vitro* sur des lignées cellulaires intestinales et *in vivo* dans des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale (Shapiro *et al.* 2007; Romier *et al.* 2009). La plupart de ces études ont été réalisées avec des polyphénols purifiés, quelques-unes ont utilisé des extraits végétaux riches en polyphénols et très peu ont évalué l'impact d'aliments entiers.

2. Polyphénols et inflammation : données *in vitro* sur des lignées cellulaires (cellules intestinales)

La plupart des études *in vitro* sont menées sur des lignées humaines (Caco-2, HT29, HCT116, SW620, T84 et CW-2) et murines (IEC, IEC-6, IEC-18, Mode-K). L'inflammation est modélisée sur ces lignées cellulaires par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) ou de LPS dans le milieu de culture. Les doses testées vont de 0,1 à 400 μ M pour les polyphénols purifiés avec une prédominance de concentrations proches de 50 μ M. Lorsque les études utilisent des extraits végétaux, les doses vont de 2 à 500 μ g/ml sans qu'une concentration ne prédomine plus particulièrement. Les analyses menées *in vitro* ont montré que les polyphénols interféraient avec les voies de signalisation de l'inflammation. De nombreux composés agissent sur la voie NF- κ B (Romier *et al.* 2009). Sur la lignée IEC-18, la lutéoline bloque l'étape de phosphorylation de I- κ B et inhibe la translocation dans le noyau de la sous-unité RelA du facteur de transcription (Kim *et al.* 2005). Ceci a également été décrit pour l'EGCG sur la lignée IEC-6 (Yang *et al.* 2001). Sur des cellules Caco-2, il a été montré que la chrysine et l'acide ellagique inhibent l'activité de transcription de NF- κ B et que la chrysine diminue la phosphorylation d'I- κ B et la sécrétion d'IL-8 elle-même régulée par la voie de signalisation de NF- κ B (Romier *et al.* 2008). La quercétine a des effets similaires sur les lignées humaines HCT116, SW620 et HT29 (Kim *et al.* 2005). Cependant, le resvératrol et la génistéine ont montré une activité stimulatrice de NF- κ B dans les cellules Caco-2 (Romier *et al.* 2008). Ces études ont également montré que les polyphénols réduisaient la sécrétion de modulateurs pro-inflammatoires. Le kaempférol, la génistéine et l'EGCG diminuent la sécrétion d'IL-6 par les cellules Caco-2 (Paradkar *et al.* 2004). La diminution de sécrétion

de l'IL-8 a également été décrite pour l'EGCG sur les cellules HT29 et T84 (Porath *et al.* 2005). L'EGCG diminue également la sécrétion de TNF- α , de prostaglandine E2 et de COX-2 (Porath *et al.* 2005). Récemment il a également été montré que les polyphénols de l'huile d'olive (tyrosol et hydroxytyrosol) réduisent la peroxydation lipidique (MDA) dans les cellules Caco-2. Des résultats similaires sont observés pour l'acide homovanillique, métabolite de l'hydroxytyrosol (Deiana *et al.* 2010).

Les études menées avec des extraits végétaux riches en polyphénols montrent des résultats similaires. Une étude menée sur des cellules Caco-2 avec des extraits de pépins de raisin, de cacao, de canne à sucre, de mangoustan et de grenade a montré une inhibition de l'activité NF- κ B par les extraits de canne à sucre et de grenade. Ces mêmes extraits de grenade diminuent la sécrétion de \cdot NO, d'IL-8 et de PGE₂. La diminution de PGE₂ a également été observée pour les extraits de cacao (Romier-Crouzet *et al.* 2009). Par ailleurs, l'inhibition de la voie de signalisation des MAPK via la diminution du facteur de transcription STAT-1 α par des extraits de thé vert dans des cellules DLD-1 humaines se traduit par une diminution de l'expression de l'iNOS (Tedeschi *et al.* 2004) (**Tableau 8**).

3. Polyphénols et inflammation intestinale : données chez l'animal

Les études chez les rongeurs ont été menées à l'aide des différents modèles d'inflammation intestinale précédemment décrits (DSS, TNBS, AOM...). Selon les études, les animaux sont traités avec les polyphénols avant, pendant et/ou après l'induction de l'inflammation intestinale. Les polyphénols sont administrés par voie orale (par gavage ou par inclusion dans l'alimentation) ou, dans certains cas, par injection intrapéritonéale (IP) (Romier *et al.* 2009).

Les études mesurant l'effet des polyphénols purifiés chez l'animal au cours de l'inflammation intestinale sont réalisées avec des doses allant de 0,1 à 1600 mg/kg/j. Les doses proches de 10 mg/kg/j sont les plus fréquemment utilisées. En ce qui concerne les études portant sur les extraits végétaux, les doses se situent dans un intervalle de 30 à 500 mg/kg/j et la plupart sont proches de 30 mg/kg/j. Certains composés ont suscité à ce jour un plus grand intérêt que d'autres : c'est le cas du resvératrol, de la quercitrine (quercétine 3-rhamnoside) ou encore de la curcumine (Romier *et al.* 2009) (**Tableaux 9 et 10**).

a. Polyphénols et aspects cliniques de l'inflammation intestinale

Les effets de la consommation de polyphénols s'observent chez l'animal au niveau des paramètres cliniques de l'inflammation. Ainsi, dans un modèle d'inflammation aiguë par administration de DSS chez le rat, la consommation préventive de resvératrol pendant 20 jours à la dose 1 mg/kg/j permet de maintenir la consommation alimentaire et la prise de poids des animaux (Larrosa *et al.* 2009). Cet effet bénéfique du resvératrol (3 mg/kg/j) se retrouve chez la souris lors d'une inflammation chronique dans la mesure où il retarde la perte de poids après induction de l'inflammation par le DSS (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). Il retarde également l'augmentation du DAI en limitant l'apparition de diarrhée ou de saignements rectaux et réduit fortement la mortalité des souris (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). Cependant, le resvératrol présente des effets moins marqués sur la perte de poids lorsqu'il est administré de manière plus ponctuelle (48h, 24h et 1h avant et 24 h après induction de l'inflammation) dans un modèle TNBS chez le rat et ce, même à des doses plus élevées (5 et 10 mg/kg, administré par gavage) (Martin *et al.* 2004). Des effets similaires sont observés pour la quercitrine qui permet, administrée en même temps que le DSS et à faible dose (1 mg/kg/j), de diminuer le DAI. Cet effet se retrouve lorsque la quercitrine est administrée de manière curative une fois l'inflammation induite par le DSS (Camuesco *et al.* 2004). D'autres polyphénols plus complexes ont également montré des effets protecteurs, comme le verbascoside qui, administré par gavage, atténue la perte de poids induite par le DNBS chez le rat (Mazzon *et al.* 2009). Cet effet se confirme lorsque le verbascoside est administré par injection IP chez des souris recevant du DSS (Hausmann *et al.* 2007).

Ces effets observés pour des composés purifiés se retrouvent également pour des extraits de plantes riches en polyphénols. C'est le cas d'un extrait de *Patrinia scabiosaefolia* renfermant 26,6 µg/ml d'acides phenoliques et 5,1 µg/ml de flavonoïdes. Son administration concomitante à celle du DSS permet de limiter l'inflammation puisque le DAI est réduit de manière dose-dépendante chez la souris (Cho *et al.* 2010). Dans le même modèle, un extrait de *Scutellariae radix* riche en flavonoïdes (wogonine, baicaléine et baicaline) administré chez le rat (100 mg/kg/j) atténue la perte de poids et limite la rétraction du côlon (Chung *et al.* 2007).

Par ailleurs, l'inflammation intestinale induit une anémie caractérisée par une diminution du taux d'hémoglobine accompagnée d'une réduction du nombre d'hématies et

de l'hématocrite. Ces symptômes sont atténués par la consommation de resvératrol ou de wogonine (Lim 2004; Larrosa *et al.* 2009). Des effets similaires ont été décrits pour l'infusion de rooibos (*Aspalathus linearis*) riche en flavonoïdes (Baba *et al.* 2009) ainsi que pour des extraits de grenade riches en ellagitanins et pour leurs principaux métabolites, les urolithines (Larrosa *et al.* 2010)

Les effets protecteurs des polyphénols sur la prise de poids des animaux et les manifestations de l'inflammation (diarrhée et saignements rectaux) se confirment lors de l'examen histologique des côlons.

b. Polyphénols et protection du côlon

b.1. Altérations macroscopiques

Comme décrit précédemment, l'inflammation intestinale se caractérise par un raccourcissement du côlon et la présence de zones hémorragiques. Les effets protecteurs des polyphénols s'observent également à ce niveau. Ainsi, le resvératrol (1 mg/kg/j) administré préventivement chez le rat DSS limite de 50% le raccourcissement du côlon induit par l'inflammation (Larrosa *et al.* 2009). L'administration du resvératrol à dose plus élevée (5 et 10 mg/kg/j) mais de manière plus ponctuelle (de 48 h avant à 24 h après l'induction de l'inflammation) permet, même s'il ne limite pas la perte de poids, de réduire l'œdème et l'ulcération du côlon et les zones hémorragiques (Martin *et al.* 2004). L'effet protecteur des polyphénols sur la rétraction du côlon est également observé avec la curcumine (Arafa *et al.* 2009), la quercitrine (Camuesco *et al.* 2004; Camuesco *et al.* 2006), l'hespéridine (Xu *et al.* 2009), la wogonine (Lim 2004) ou encore avec le rutoside tandis que son aglycone, la quercétine, est sans effet (Kwon *et al.* 2005b).

b.2. Altérations histologiques

L'analyse histologique des côlons permet d'évaluer l'effet protecteur des composés contre les altérations tissulaires provoquées par l'agent inflammatoire. Ainsi l'administration de picéatannol permet la réduction du score histologique et donc de la sévérité de la colite chez la souris pour des doses allant de 2,5 à 10 mg/kg (Kim *et al.* 2008). Ceci s'observe également pour la curcumine (4 mg/kg/j) (Deguchi *et al.* 2007) et le verbascoside (120 ou 600 µg/souris/j en IP) (Hausmann *et al.* 2007). De tels effets ont également été décrits chez le rat pour le verbascoside (2 mg/kg/j) (Mazzon *et al.* 2009), le

rutoside (10 et 25 mg/kg) (Cruz *et al.* 1998), la morine (25 mg/kg/j) (Cruz *et al.* 1998) et l'acide ellagique (10mg/kg/j) (Galvez *et al.* 2001). L'extrait de *Patrinia scabiosaefolia* (10 mg/kg) agit également chez la souris (Cho *et al.* 2010) tout comme l'extrait de *Scutellariae radix* (100 mg/kg/j) chez le rat (Chung *et al.* 2007).

c. Polyphénols et marqueurs de l'inflammation

c.1. Activité myéloperoxydase

Le dosage de l'activité de la MPO dans la muqueuse colique est utilisé comme marqueur de l'inflammation dans la mesure où il témoigne de l'infiltration des tissus par les PNN. De nombreux composés de nature polyphénolique ont montré qu'ils permettaient de limiter la colonisation du tissu colique par ces cellules inflammatoires au travers d'une réduction d'activité de cette enzyme comme en témoignent les données rassemblées dans les **tableaux 9 et 10**. Ainsi, l'activité de l'enzyme est significativement diminuée après administration de resvératrol (Martin *et al.* 2004). Un effet particulièrement marqué a été décrit pour la curcumine chez des rats recevant du DSS à 3% : administrée par injection IP, elle permet le retour de l'activité MPO à une valeur proche de celle mesurée chez les rats sains (Arafa *et al.* 2009). Administrée par voie orale chez la souris Balb/c, la curcumine permet une réduction de l'activité de la MPO de l'ordre de 50% (Deguchi *et al.* 2007). Des effets similaires ont été décrits pour la quercitrine : chez le rat, elle diminue l'activité enzymatique de 57% lorsqu'elle est consommée préventivement et de 60% lorsqu'elle est administrée une fois la colite établie (Camuesco *et al.* 2004). L'utilisation préventive d'extraits végétaux comme l'extrait méthanolique de *Zataria multiflora* Boiss contenant de la lutéoline permet également de limiter la réaction inflammatoire comme en témoigne la réduction de l'activité MPO (Nakhai *et al.* 2007). Cependant, dans certaines conditions, certains polyphénols ou extraits de plantes ne limitent pas l'inflammation. C'est le cas du verbascoside qui, administré en IP à des souris, ne diminue pas l'activité MPO lors d'une inflammation aiguë mais la réduit au cours d'une inflammation chronique (Hausmann *et al.* 2007). De la même manière, l'infusion de *Turnera ulmifolia* ne réduit pas significativement l'activité MPO après induction d'une inflammation colique par le TNBS (Galvez *et al.* 2006).

c.2. Autres marqueurs de l'inflammation

Certains polyphénols diminuent l'activité d'enzymes telles que la COX-2 stimulée lors de l'inflammation. Cette diminution d'activité est fréquemment associée à une réduction du taux de PGE₂, produit de son activité. Par exemple, la consommation de resvératrol diminue nettement l'activité de la COX-2 mais aussi de la prostaglandine-E synthase (PTGES) chez des rats dont l'inflammation a été induite par le DSS (Larrosa *et al.* 2009). De plus, le resvératrol induit également une diminution de l'expression de ces protéines (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). La diminution de l'expression génique de COX-2 peut également être induite par le rutoside dans le modèle DSS (Kwon *et al.* 2005b). Des résultats similaires sont observés pour les polyphénols du thé noir et du vin rouge (Luceri *et al.* 2002) ou pour des extraits de *Mangifera indica* L. (Marquez *et al.* 2010), des pommes (Castagnini *et al.* 2009), le picéatannol (Kim *et al.* 2008), l'acide coumarique (Luceri *et al.* 2004) et la curcumine (Camacho-Barquero *et al.* 2007) dans divers modèles d'inflammation colique. De plus, une diminution de l'expression des métalloprotéinases matricielles MMP-9 et MMP-2 impliquées dans le développement de l'inflammation intestinale a également été décrite pour le verbascoside (Mazzon *et al.* 2009).

d. Polyphénols et modulation de la réaction immunitaire intestinale

Les polyphénols permettent également de limiter la réponse immunitaire au cours de l'inflammation intestinale. Ils limitent la colonisation des tissus par les PNN comme en témoigne la diminution d'activité MPO précédemment décrite. La consommation de quercitrine diminue l'infiltration de la muqueuse colique par les macrophages et les PNN (Camuesco *et al.* 2004). Dans les ganglions mésentériques de souris enflammées, la wogonine induit une diminution de la quantité de lymphocytes T CD8+, conduisant ainsi à une diminution du ratio CD4⁺/CD8⁺ (Lim 2004). Par immunomarquage il a été montré que la curcumine diminuait l'infiltration de la muqueuse colique par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Deguchi *et al.* 2007). Cette diminution de l'infiltration du tissu colique par les cellules immunitaires pourrait s'expliquer par un effet inhibiteur des polyphénols sur l'expression des protéines de reconnaissance comme cela a été décrit pour le verbascoside qui agirait sur la P-sélectine et ICAM au niveau des vaisseaux de la *lamina propria* (Mazzon *et al.* 2009).

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est également inhibée par les polyphénols. C'est le cas du TNF- α dont les concentrations dans le côlon sont réduites par la curcumine (Camacho-Barquero *et al.* 2007; Villegas *et al.* 2011), le picéatannol (Lim 2004), le resvératrol (Martin *et al.* 2006; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010), la quercitrine (Camuesco *et al.* 2006), le verbascoside (Mazzon *et al.* 2009) ou des extraits de *Ginkgo biloba* (Mustafa *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006). De la même manière, les taux d'IL-1 β sont diminués par le resvératrol (Martin *et al.* 2004), le verbascoside (Mazzon *et al.* 2009) et un extrait de *Patrinia scabiosaefolia* (Cho *et al.* 2010). Le picéatannol (Kim *et al.* 2008), le rutoside (Kwon *et al.* 2005b), les extraits de *Ginkgo biloba* (Zhou *et al.* 2006) réduisent également le taux ou l'expression de l'IL-6. Chez le rat HLA-B27, la consommation régulière d'un lyophilisat de pommes diminue l'expression du gène de l'IFN- γ (Castagnini *et al.* 2009). L'effet des polyphénols s'exerce également sur les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 dont la diminution due à l'inflammation est en partie corrigée par le resvératrol (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010) ou la curcumine (Camacho-Barquero *et al.* 2007). Ces effets sur les cytokines ne se mesurent pas uniquement dans la muqueuse colique mais se répercutent également au niveau systémique. On peut noter dans le sérum une diminution du TNF- α lors de l'administration de curcumine (Arafa *et al.* 2009) ou de l'IL-6 lors de l'administration d'héspéridine (Xu *et al.* 2009).

Des études menées sur des suspensions de cellules en culture issues des ganglions mésentériques d'animaux enflammés ont montré une diminution de la sécrétion de l'IL-10, du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF par le verbascoside (Hausmann *et al.* 2007), une diminution du TNF- α , de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 par la wogonine (Lim 2004). L'expression de ces cytokines est en partie régulée par la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B. Les polyphénols peuvent également agir au niveau de celui-ci. Par exemple, l'extrait de *Ginkgo biloba* diminue l'expression de la sous-unité p65 de ce facteur de transcription (Zhou *et al.* 2006) et le verbascoside entraîne l'inhibition de la dégradation de I κ B et la translocation de NF- κ B dans le noyau (Mazzon *et al.* 2009). Des analyses en immuno-marquage suite à l'administration de curcumine ont également montré cette absence de la sous-unité p65 dans les noyaux des cellules épithéliales et inflammatoires ainsi que la forte présence de l'inhibiteur I κ B- α inhibant la translocation de cette sous-unité dans les noyaux (Deguchi *et al.* 2007).

Ainsi, au cours de la colite, l'administration de polyphénols permet de limiter la migration des cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages et PNN) et le développement de la réaction inflammatoire en agissant sur le facteur de transcription NF- κ B ce qui se répercute sur les taux de cytokines pro-inflammatoires au niveau local et systémique.

e. Polyphénols et stress oxydant au niveau intestinal

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammation intestinale est couramment associée au stress oxydant suite à la production d'EROs et d'ERAs par les cellules immunitaires. A cela s'associe une altération des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques. Les polyphénols ont été largement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes intrinsèques mais également pour leur capacité à stimuler les défenses antioxydantes cellulaires.

e.1. Les polyphénols limitent la production d'espèces oxydantes

Les cellules immunitaires colonisant la muqueuse intestinale produisent de grandes quantités d'EROs, en particulier l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et l'acide hypochloreux HOCl. L'augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ par les PNN infiltrés est réduite par une consommation préventive de théarubigine (Maity *et al.* 2003). Au cours de l'inflammation, le radical hydroxyle est augmenté dans les tissus et le plasma. Cette augmentation d' $\cdot OH$ est diminuée chez la souris par l'administration de lutéoline (Ashokkumar *et al.* 2008). Le monoxyde d'azote entre également en jeu dans le phénomène du stress oxydant et sa production est augmentée au cours de l'inflammation. De nombreuses études ont mis en évidence un effet inhibiteur des polyphénols sur la production du $\cdot NO$. C'est le cas de la curcumine (Arafa *et al.* 2009), du resvératrol (Larrosa *et al.* 2009) ou du picéatannol (Kim *et al.* 2008). Fréquemment cette diminution du $\cdot NO$ est associée à une inhibition de l'activité et/ou de l'expression de l'iNOS comme cela a été observé suite à l'administration de quercitrine (Camuesco *et al.* 2004). De la même manière, un extrait de *Patrinia scabiosaefolia* inhibe l'expression de l'iNOS ainsi que la production de $\cdot NO$ de manière dose-dépendante (Cho *et al.* 2010). Ces effets sur l'expression de l'iNOS et la production de $\cdot NO$ sont retrouvés pour d'autres composés comme le picéatannol (Kim *et al.* 2008), la curcumine (Camacho-Barquero *et al.* 2007; Villegas *et al.* 2011), le verbascoside (Mazzon

et al. 2009) ou encore pour des extraits de vin rouge et de thé noir (Luceri *et al.* 2002). Par ailleurs, la nitrotyrosine issue de la formation du peroxy-nitrite à partir du NO est particulièrement présente autour des cellules inflammatoires et des vaisseaux mais sa présence est diminuée lors de l'administration de verbascoside (Mazzon *et al.* 2009).

e.2. Les polyphénols diminuent l'oxydation des macromolécules

La peroxydation lipidique est couramment décrite au cours de l'inflammation intestinale et les polyphénols peuvent apporter une protection à ce niveau. Ainsi la curcumine (Arafa *et al.* 2009), un extrait de *Ginkgo biloba* (Zhou *et al.* 2006) ou de *Zataria multiflora* (Nakhai *et al.* 2007) et la théarubigine (Maity *et al.* 2003) permettent de diminuer le taux de MDA au niveau colique. L'administration de lutéoline diminue le taux des TBARS dans la muqueuse colique et le plasma (Ashokkumar *et al.* 2008). Des effets similaires existent également pour le verbascoside qui diminue le taux de TBARS de manière dose-dépendante (Mazzon *et al.* 2009), pour l'héspéridine (Xu *et al.* 2009) et pour les polyphénols du vin rouge (Canali *et al.* 2000). Bien que le resvératrol ait montré de nombreux effets protecteurs, sa consommation à titre préventif dans le modèle DSS n'exerce pas d'effet préventif sur la peroxydation lipidique (Larrosa *et al.* 2009).

Les hydroperoxydes produits par les EROs peuvent former des liaisons avec les guanines de la chaîne d'ADN donnant ainsi des adduits. L'augmentation de ces adduits MDA-ADN décrite dans le modèle de carcinogenèse colique à l'AOM chez le rat est réduite par la lutéoline (Ashokkumar *et al.* 2008). L'ingestion de polyphénols du vin rouge permet également de limiter l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques (Dolara *et al.* 2005). La mesure dans les urines du taux de 8-OHdG comme marqueur de l'oxydation de l'ADN montre également un effet protecteur lié à la consommation d'infusion de rooïbos dans le modèle DSS chez le rat (Baba *et al.* 2009). L'administration orale d'un extrait de *Garcinia cambogia* induit une diminution de l'oxydation de l'ADN dans les cellules coliques chez le rat TNBS (dos Reis *et al.* 2009).

e.3. Les polyphénols améliorent les défenses antioxydantes

- Le glutathion

La consommation de polyphénols permet de limiter en partie ou de corriger la diminution du GSH observée lors de l'inflammation intestinale (Romier *et al.* 2009). Dans différents modèles d'inflammation colique, la quercitrine (Camuesco *et al.* 2004; Camuesco *et al.* 2006), la curcumine (Arafa *et al.* 2009) et la lutéoline (Ashokkumar *et al.* 2008) permettent le rétablissement d'une concentration normale en GSH dans le côlon. Dans un modèle TNBS chez le rat, le rutoside augmente le GSH colique sans toutefois le ramener à son niveau basal (Cruz *et al.* 1998). La supplémentation de l'alimentation ou l'administration orale d'extraits végétaux riches en polyphénols comme celui de *Ginkgo biloba* (Mustafa *et al.* 2006) ou de *Mangifera indica* (Marquez *et al.* 2010) corrigent également la chute du taux de GSH. Les polyphénols du thé vert quant à eux n'augmentent pas le taux de GSH réduit dans le côlon lors de l'inflammation induite par le DSS mais ils induisent une augmentation du GSH réduit dans le plasma, favorisant ainsi le maintien d'un ratio glutathion réduit / glutathion dissulfide proche de celui de l'animal sain (Oz *et al.* 2005). Par ailleurs, certains extraits végétaux comme l'infusion de *Turnera ulmifolia* montrent également un effet protecteur sur le taux de GSH même s'ils ne présentent pas d'effets sur l'activité MPO ou la longueur du côlon (Galvez *et al.* 2006).

- Défenses antioxydantes enzymatiques

Si les polyphénols limitent l'oxydation des structures cellulaires par piégeage des radicaux libres, ils peuvent également agir en modulant l'expression et l'activité des systèmes de défense enzymatiques. Ainsi, il a été montré que certains polyphénols ou extraits végétaux riches en polyphénols contrecarriaient la diminution d'activité de la SOD observée lors d'une inflammation intestinale. Une augmentation de l'activité de cette enzyme a été observée lors de l'administration de lutéoline dans le modèle AOM chez le rat (Ashokkumar *et al.* 2008) mais également lors de la consommation préventive d'infusion de rooïbos dans le modèle DSS chez le rat (Baba *et al.* 2009), lors de l'administration de resvératrol dans ce même modèle chez la souris (Yao *et al.* 2010) et lors de l'administration préventive d'EGCG dans le modèle TNBS chez le rat (Mochizuki *et al.* 2005). Cette augmentation d'activité de la SOD induit potentiellement une augmentation du H₂O₂ dans les tissus. Ainsi une augmentation d'activité des enzymes CAT et GPx est également nécessaire afin de limiter ses effets oxydatifs.

Peu de données sont disponibles concernant la modulation de l'activité de la CAT par les polyphénols au cours de l'inflammation intestinale. Il a cependant été montré que l'administration de lutéoline contrecarrait la chute de l'activité CAT au cours de la carcinogenèse colique (Ashokkumar *et al.* 2008). Une augmentation de l'activité CAT a été décrite après administration de polyphénols du vin rouge au cours de l'inflammation intestinale (Canali *et al.* 2000). Par ailleurs, la consommation de jus de pomme riche en polyphénols induit une augmentation de l'expression du gène CAT chez le rat sain (Soyalan *et al.* 2011).

Certaines de ces études montrent également une augmentation de l'activité de la GPx (Canali *et al.* 2000; Ashokkumar *et al.* 2008). Suite à sa diminution au cours de l'inflammation intestinale, l'activité GPx est induite par une supplémentation en resvératrol (Yao *et al.* 2010). A cette augmentation d'activité GPx est associée une augmentation de l'activité GR permettant la réduction du glutathion oxydé précédemment généré (Ashokkumar *et al.* 2008).

De plus, certains auteurs ont observé dans des modèles d'inflammation intestinale que l'administration de polyphénols comme la curcumine (Arafa *et al.* 2009) ou les polyphénols du vin rouge (Luceri *et al.* 2002) corrigeaient la diminution d'activité de la glutathion-S-transférase permettant ainsi la formation de dérivés mercapturiques à partir du GSH et de composés aldéhydiques en vue de la détoxification de la cellule.

III. L'infusé de verveine odorante

Les tisanes représentent une source majeure de composés phénoliques dans notre alimentation (Atoui *et al.* 2005). Parmi les tisanes les plus consommées, l'infusé de verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) est connu pour ses propriétés aromatiques, digestives et anti-spasmodiques.

A. La verveine odorante : *Aloysia triphylla*

La verveine odorante, *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton ou *Lippia citriodora* (Kunth.), est un sous-arbrisseau de la famille des Verbenaceae, originaire d'Amérique du Sud, introduit et cultivé sur le pourtour méditerranéen (midi de la France et Afrique du Nord). « Il s'agit d'un arbrisseau ramifié dont les tiges anguleuses et cannelées portent des feuilles rudes, courtement pétiolées, verticillées par 3. Les fleurs disposées en épis possèdent 4 pétales soudés à la base en un tube et étalés en 4 lobes bicolores : blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne » (Bruneton 2009). La verveine odorante est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées. Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles sont mondées une fois séchées puis consommées en infusion (Perrot *et al.* 1974).

B. Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Lippia* (Verbenaceae) comprend environ 200 espèces d'herbes, arbustes et arbrisseaux. La plupart des espèces sont traditionnellement utilisées comme remèdes gastro-intestinaux et respiratoires. Les parties utilisées de la plante sont les feuilles, les parties aériennes et les fleurs. L'infusé de feuille de verveine odorante est consommé traditionnellement dans l'ensemble de l'Amérique centrale et de l'Amérique du sud, en Afrique tropicale et dans certains pays européens comme traitement gastro-intestinal et sont considérées comme particulièrement efficace pour le traitement des douleurs stomacales et l'indigestion. La verveine odorante peut également être consommée pour ses propriétés anti-spasmodiques ainsi que pour lutter contre la fièvre. Les feuilles peuvent également être utilisées comme assaisonnement dans certaines préparations culinaires (Pascual *et al.* 2001).

C. Composition en polyphénols de l'infusé de verveine odorante

Bien que l'infusé de feuilles de verveine odorante soit largement consommé, sa composition qualitative et quantitative en polyphénols est encore mal connue. Une première analyse de sa composition avait été réalisée au laboratoire (Carnat *et al.* 1999). Cette étude rapporte la présence dans l'infusé de flavonoïdes, principalement la lutéoline 7-diglucuronide, et de dérivés hydroxycinnamiques dont le principal est le verbascoside. Plus récemment, des études ont identifié dans l'infusion de verveine odorante, outre la lutéoline 7-diglucuronide et le verbascoside, des dérivés diglucuronidés d'apigénine et de chrysoériol ainsi qu'un isomère du verbascoside, l'isoverbascoside (Bilia *et al.* 2008; Quirantes-Pine *et al.* 2009) (**Figure 38**). Par ailleurs, l'instabilité du verbascoside et de son isomère à la chaleur a été soulignée (Bilia *et al.* 2008). D'un point de vue quantitatif, la concentration en polyphénols de l'infusion de verveine odorante a été évaluée à 675 mg/l dont 24% de flavonoïdes et 76% d'acides phénoliques, la teneur des 2 principaux constituants, lutéoline 7-diglucuronide et verbascoside, étant respectivement de 100 mg/l et 500 mg/l (Carnat *et al.* (1999).

D. Propriétés antioxydantes de l'infusé de verveine odorante

Etant donnée la composition en polyphénols de l'infusé de verveine odorante, certaines études se sont intéressées aux effets antioxydants de cet infusé. Des analyses menées *in vitro* à l'aide de différents tests ont permis de montrer les propriétés antioxydantes de l'infusé. L'infusé de verveine odorante et le verbascoside se sont révélés plus actifs que le Trolox lors d'un test au DPPH (Bilia *et al.* 2008). L'infusé a une forte activité de piégeage du radical superoxyde et une activité plus modérée vis-à-vis du radical hydroxyle et de l'acide hypochloreux (Valentao *et al.* 2002). A forte concentration, un effet prooxydant a par ailleurs été rapporté (Valentao *et al.* 2002). Un extrait de verveine odorante standardisé à 25% de verbascoside a montré une forte activité antioxydante dans un milieu lipophile, ce qui pourrait indiquer une capacité à piéger les radicaux libres au niveau des membranes biologiques (Funes *et al.* 2009). De même, cet extrait ainsi que le verbascoside lui-même inhibent la peroxydation lipidique *in vitro* (Funes *et al.* 2009). Ces effets antioxydants de la verveine odorante ont également été observés *ex vivo* sur du plasma de rats ayant préalablement consommé un extrait de verveine odorante. Le pic plasmatique de concentration en verbascoside est corrélé à l'activité antioxydante plasmatique maximale

évaluée par la détermination du MDA plasmatique, du FRAP et de l'activité SOD (Funes *et al.* 2009).

Ainsi, les propriétés digestives et antispasmodiques pour lesquelles l'infusé de verveine odorante est utilisé dans la médecine traditionnelle semblent supportées par des propriétés antioxydantes marquées dues en partie à la présence de divers composés polyphénoliques tels que le verbascoside ou la lutéoline 7-diglucuronide.

OBJECTIFS

Objectifs du travail de thèse

La consommation des polyphénols, micronutriments largement répandus dans les aliments d'origine végétale, a été associée à une diminution du risque de développement de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives ou le cancer. De plus, de nombreuses études ont montré des effets bénéfiques de ces composés *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, du fait de leur faible absorption au niveau de l'intestin grêle, les polyphénols sont présents en grande quantité dans le côlon où ils peuvent exercer des propriétés anti-inflammatoires.

Parmi les sources alimentaires de polyphénols, les tisanes pourraient jouer un apport intéressant. La verveine odorante, *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton, est une plante médicinale connue pour ses vertus thérapeutiques digestives et antispasmodiques et couramment consommée en infusion. L'infusé de feuilles de verveine odorante contient de grandes quantités de polyphénols, acides phénoliques complexes et dérivés de flavones.

L'inflammation intestinale fait interagir le système immunitaire intestinal avec de nombreux facteurs environnementaux et est fréquemment associée à une augmentation du stress oxydant via la production d'EROs par les cellules immunitaires. De nombreuses études sur des modèles expérimentaux chez les rongeurs (rats et souris) ont montré des effets protecteurs anti-inflammatoires et antioxydants des polyphénols sur ce type d'inflammation. De plus, il a été suggéré que les polyphénols puissent être additionnés aux traitements des maladies inflammatoires chroniques intestinales chez l'homme.

L'objectif général de cette thèse a donc été d'évaluer l'effet d'une consommation régulière et préventive d'un infusé de verveine odorante à dose nutritionnelle sur le développement d'une inflammation intestinale chez le rat.

Tout au long de nos travaux, nous avons utilisé un même lot de feuilles de verveine odorante fourni par BIOSPHERE, partenaire de ce projet de recherche. Deux types d'infusés ont été utilisés au cours de nos études. Le premier infusé, qualifié de « forte dose », a été préparé par infusion de 40 g de feuilles de verveine en poudre dans 1 litre d'eau bouillante pendant 30 min (40 g/l). Le second infusé, qualifié de « faible dose », a été préparé de manière identique puis dilué 10 fois dans de l'eau (4 g/l). Les infusés ont été préparés au laboratoire avant chaque étude et administrés *ad libitum* deux semaines avant l'induction de l'inflammation intestinale et jusqu'au sacrifice des animaux. Les quantités de polyphénols

ainsi consommées correspondent à des doses nutritionnelles chez l'homme. Nous avons utilisé pour nos travaux un modèle d'inflammation colique modérée susceptible d'être modulée par des facteurs nutritionnels. Ainsi, l'inflammation colique a été induite par administration de DSS à 4% dans la boisson.

Dans une première étude, nous avons évalué chez le rat l'effet de la consommation préventive d'un infusé de verveine odorante à forte dose (40 g/l) sur le développement d'une inflammation intestinale induite par administration de DSS à 4% pendant 7 jours. Les différents signes cliniques de l'inflammation ont été suivis. Les altérations histologiques et des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant ont été déterminés. Les populations de cellules immunitaires dans le sang et les structures lymphoïdes secondaires ont également été évaluées. D'autre part, l'étude du métabolisme et de l'excrétion urinaire des polyphénols de la verveine odorante en situation inflammatoire ou non a été initiée.

Certaines études ont montré que les effets des polyphénols pouvaient varier en fonction des concentrations utilisées et que de trop fortes doses pouvaient dans certains cas avoir des effets délétères. Ainsi, nous avons étudié dans un second temps l'effet de la consommation d'un infusé de verveine odorante à faible dose (4 g/l) sur le même modèle d'inflammation modérée. Nous avons déterminé les paramètres cliniques, des marqueurs de l'inflammation et les populations de cellules immunitaires. Les effets bénéfiques des polyphénols sur l'inflammation intestinale ont été fréquemment associés à leur capacité à piéger les radicaux libres mais également à stimuler les défenses antioxydantes. Nous avons donc choisi d'évaluer l'activité des différents systèmes de défenses antioxydants ainsi que l'effet protecteur des polyphénols sur la peroxydation lipidique.

Dans une troisième étude, nous avons choisi d'augmenter la durée de l'induction de l'inflammation. Nous avons alors comparé les effets de la consommation préventive des deux infusés (faible et forte dose) après administration de DSS à 4% pendant 9 jours. L'ensemble des paramètres évalués dans les deux précédentes études a été mesuré. Plusieurs études ayant montré la capacité des polyphénols à moduler la production de cytokines, les concentrations de différentes cytokines ont été déterminées au niveau colique.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

I. Préparation de l'infusé de verveine odorante

Les infusés ont été préparés au début de chaque étude. Les feuilles coupées de verveine odorante (40 g) (3inature Biosphère, Saint-Bonnet-de-Rochefort) ont été infusées dans de l'eau bouillante (1 litre) pendant 30 min. L'infusé a ensuite été filtré sur verre fritté de porosité 0. Le même mode opératoire suivi d'une dilution au dixième dans de l'eau a été adopté pour la préparation des infusés à 4 g/l des études 2 et 3. Les infusés ont été aliquotés en fonction des volumes nécessaires à chaque jour d'expérimentation et conservés à -20°C.

II. Analyse des polyphénols dans l'infusé de verveine odorante et les urines de rats ayant consommé l'infusé

A. Analyse HPLC de l'infusé de verveine odorante

L'infusé de verveine odorante a été analysé par HPLC afin de déterminer les concentrations en acides phénoliques complexes et glycosides de flavones. Les acides phénoliques complexes (verbascoside et isoverbascoside) ont été dosés directement dans les infusés dilués dans l'eau distillée (dilution 100 fois pour l'infusé 40 g/l et dilution 10 fois pour l'infusé 4 g/l). Les glycosides de flavones n'étant pas complètement caractérisés, une étape d'hydrolyse a été nécessaire afin de pouvoir quantifier ces composés sous forme d'aglycones. Les échantillons d'infusés ont alors été dilués 50 fois (infusé 40 g/l) ou 5 fois (infusé 4 g/l) dans l'eau distillée et incubés 15 min à 37°C en présence de 6×10^6 U/l de β -glucuronidase et de 5×10^4 U/l de sulfatase (issues de *H. pomatia*, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier) afin d'hydrolyser les liaisons glycosidiques. Ceci permet une hydrolyse totale des glycosides de flavones de la verveine odorante. Les échantillons ont ensuite été traités par addition de 2,4 volumes d'acétone puis centrifugés pendant 5 min à 4500 g. Le surnageant a été évaporé au volume initial sous courant d'hélium puis dilué au demi dans l'éthanol.

Les acides phénoliques complexes ainsi que les génines de flavones ont été identifiés et quantifiés par HPLC à l'aide d'une barrette de diode (DAD 200 photodiode array detector, Perkin-Elmer, Courtabœuf) et d'un détecteur UV-visible 785 A (Perkin-Elmer) à 350 nm et 320 nm respectivement. Les échantillons (20 μ l) ont été injectés sur une colonne Uptisphere C₁₈ -5 μ m (150 x 4,6 mm) protégée par une pré-colonne (Uptisphere C₁₈ -5 μ m, 10 x 4 mm) (Interchim, Montluçon). L'élution des composés a été réalisée en utilisant une solution

eau/H₃PO₄ (99:1) en tant que solvant A et de l'acétonitrile en tant que solvant B à un débit de 1 ml/min. L'analyse a été menée avec un gradient linéaire A pour les acides phénoliques complexes et avec un gradient linéaire B pour les flavones (**Tableau 11**).

Les polyphénols ont été identifiés par comparaison des temps de rétention et des spectres d'absorption avec des composés purifiés. Les concentrations en acides phénoliques complexes ont été déterminées à l'aide d'un standard de concentration connue de verbascoside et les génines de flavones à l'aide de standards de concentrations connues de lutéoline, apigénine et diosmétine (Extrasynthèse, Genay).

B. Analyse HPLC des urines

Afin d'étudier l'excrétion urinaire des polyphénols, les urines de 24h de rats ayant consommé l'infusé de verveine odorante ont été recueillies avant et après administration de DSS puis congelées à -20°C. Après décongélation et centrifugation à 4500 g pendant 5 min, les échantillons d'urine ont été traités afin d'identifier et de quantifier les métabolites de polyphénols. Les acides phénoliques complexes ont été quantifiés directement. Pour la détection des flavones présentes dans les urines sous forme de dérivés glucurono- et/ou sulfo-conjugués, les urines ont été incubées pendant 1 heure à 37°C en présence de 6 x 10⁶ U/l de β -glucuronidase et de 5 x 10⁴ U/l de sulfatase (issues de *H. pomatia*). Les échantillons ont ensuite été traités par addition de 2,4 volumes d'acétone et centrifugés pendant 5 min à 4500 g. Le surnageant a été évaporé au volume initial sous courant d'hélium puis dilué au demi dans l'éthanol. Les analyses HPLC ont été effectuées dans les mêmes conditions que précédemment.

Les polyphénols présents dans les urines ont été identifiés et quantifiés comme décrit précédemment.

III. Induction de l'inflammation intestinale

Au cours des trois études, des rats Wistar pesant 170-200 g (Janvier, Le Genest-Saint-Isle) ont été maintenus dans une pièce à température contrôlée (22°C) et en cycle jour/nuit inversé (période d'obscurité de 07h00 à 19h00). Les rats ont été nourris *ad libitum* avec une alimentation standard (2016 Teklad Global standard diet, Harlan, Gannat). L'inflammation colique a été induite, après une semaine d'acclimatation et deux semaines de consommation préventive d'infusé ou non, par l'administration de sulfate de dextran sodique dilué à 4% dans

la boisson. La consommation de boisson a été mesurée quotidiennement et les boissons ont été remplacées tous les jours. L'ensemble des phases expérimentales menées sur l'animal s'est déroulé au sein de l'animalerie de l'Université d'Auvergne et a été approuvé par le comité d'éthique local.

IV. Prélèvement des échantillons

A l'issue des phases expérimentales, les rats ont été anesthésiés par injection de pentobarbital sodique (40 mg/kg de poids vif) et sacrifiés par décapitation. Le sang a été prélevé sur des tubes contenant de l'EDTA et immédiatement traité pour la détermination des populations leucocytaires lors des études 1 et 2. Les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer ont été prélevés et déposés dans une boîte de pétri contenant 10 ml de RPMI (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) puis placés sous agitation lente pendant 1 heure avant extraction des populations lymphocytaires. Le côlon a été excisé depuis le cæcum jusqu'au rectum et séparé du tissu adipeux adhérent et la longueur de l'organe soumis à un poids constant de 2 g a été mesurée (**Figure 39**). Un centimètre a été prélevé à la partie proximale en vue de l'analyse histologique, ouvert longitudinalement puis fixé sur un support cartonné (**Figure 40**) et rapidement plongé dans un fixateur (alcool – formaldéhyde – acide acétique (AFA)). La partie restante a été ouverte longitudinalement, débarrassée des selles encore présentes et nettoyée à l'aide de sérum physiologique puis différemment traitée selon les études. Au cours de l'étude 1, la muqueuse a été grattée à l'aide d'une lame de verre et divisée en deux parties en vue des dosages biochimiques (MPO et stress oxydant). Au cours des études 2 et 3, la partie restante de côlon a été divisée en 4 parties longitudinales (**Figure 41**) en vue des dosages biochimiques (MPO, stress oxydant, cytokines). Les prélèvements ont été rapidement plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Le foie, la rate et le thymus ont été prélevés, pesés et rapidement plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

V. Analyse histologique du côlon

Cette technique consiste en l'évaluation de différents paramètres caractéristiques de l'inflammation intestinale sur différents niveaux de coupe du côlon, après coloration des échantillons (**Figure 42**).

A. Etape d'inclusion

La section de côlon prélevée en vue de l'analyse histologique a été divisée en trois parties longitudinales placées dans des cassettes d'inclusion. La paraffine utilisée pour l'inclusion des prélèvements n'étant pas miscible à l'eau, une étape de déshydratation est nécessaire avant l'inclusion. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol à 80%, 90% et absolu puis dans 4 bains successifs de toluène. Les échantillons ont ensuite été inclus transversalement dans des moules métalliques. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un distributeur de paraffine liquide à 55°C.

B. Réalisation des coupes et montage des lames

Après refroidissement à -20°C des blocs de paraffine contenant les prélèvements, trois niveaux de coupes de 4 µm d'épaisseur, distantes de 100 µm chacune ont été réalisés à l'aide d'un microtome manuel Microm HM 340 E (Thermo scientific, Illkirch). Les coupes ont ensuite été déposées sur des lames préalablement traitées avec une goutte d'albumine glycinée de Mallory. Les coupes ont ensuite été dépliées dans un bain d'eau chaude puis les lames ont été déposées sur une plaque chauffée à 55°C permettant le collage du prélèvement sur la lame.

C. Coloration des coupes

La coloration des coupes a été réalisée par un automate de coloration Microm HMS 740 (Thermo scientific). Dans un premier temps, les lames ont été séchées dans une étuve ventilée pendant 25 min. Dans un second temps, les échantillons ont été déparaffinés dans 2 bains successifs de méthylcyclohexane pendant 5 min suivis de 2 bains d'éthanol absolu pendant 2 min puis d'un bain d'éthanol à 70% pendant 1 min. Après un rinçage sous l'eau courante, les prélèvements ont été colorés à l'hémaréine de Groat pendant 3 min puis rincés à l'eau courante. Les lames ont ensuite été plongées dans un second colorant, la phloxine, pendant 2 min 30 s. Après rinçage à l'eau, les lames ont été plongées dans un

premier bain d'éthanol à 95% pendant 30 s puis dans deux bains successifs d'éthanol absolu pendant 1 min. Les prélèvements ont alors été colorés dans un bain de safran pendant 2 min puis les lames ont été plongées dans 2 bains successifs d'éthanol absolu pendant 5 s puis dans deux bains successifs de méthylcyclohexane pendant 30 s et 1 min. Les lames ont ensuite été placées dans une colleuse de lamelles Medite-RCM 2000 qui colle une lamelle sur le prélèvement coloré à l'aide de la colle de montage Entellan® (Merck, Lyon). Les lames ont ensuite été conservées à température ambiante.

D. Lectures des lames

Les lames ont été lues en aveugle par deux expérimentateurs à l'aide d'un microscope optique Axioskop 40 (Zeiss, Le Pecq). Le score histologique d'inflammation (moyenne des scores des trois niveaux de coupes des trois sections) a été déterminé pour chaque individu. Une grille d'évaluation a été établie d'après la littérature (Cooper *et al.* 1993) (**Tableau 12**) et huit paramètres ont été évalués selon le barème suivant : 0, morphologie normale ; 1, présence focale ; 2, présence étendue sur une coupe et focale sur les deux autres ; 3, présence étendue sur les trois sections. En cas de destruction complète de l'épithélium, un score de 14 a été appliqué en raison de l'impossibilité d'évaluer les paramètres 1, 2 et 6 et le score d'ulcération a été multiplié par 2. Un 9^{ème} paramètre, la profondeur de l'inflammation, a été évalué selon le barème suivant : 0, absence ; 1, inflammation limitée à la muqueuse ; 2, inflammation étendue à la sous-muqueuse ; 3, inflammation transmurale.

VI. Phénotypage des populations lymphocytaires dans le sang et les structures lymphoïdes secondaires

A. Numération des leucocytes sanguins

Les cellules du sang total (25 µl – 1×10^3 leucocytes) ont été marquées par des techniques d'immunofluorescence. Des anticorps anti-rat monoclonaux (BD Biosciences Pharmingen, Le-Pont-de-Claix) ont été utilisés à des concentrations saturantes pour détecter les sous-populations leucocytaires : anti-CD45 (OX-1, conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)) pour la détection des leucocytes totaux ; anti-CD45RA (OX-33, conjugué à la phycoérythrine (PE)) pour les lymphocytes B ; anti-CD3 (1FA, PE-conjugué) pour les lymphocytes T ; anti-CD4 (OX-35, conjugué à la phycoérythrine cyanine-5 (PE-Cy5)) pour les lymphocytes T helper ; anti-CD8a (OX-8, conjugué FITC) pour les

lymphocytes T cytotoxiques. Les échantillons ont été incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 min puis fixés par du formaldéhyde à 0,1% (IOTest®3) (Beckman Coulter, Roissy). Les hématies ont été lysées par addition de 1 ml de solution de lyse VersaLyse™ (Beckman Coulter). Des fluorosphères Flow-count™ (Beckman Coulter) (25 µl) ont été additionnées afin de déterminer le nombre absolu de cellules par ml de suspension. L'analyse en cytométrie en flux a été réalisée sur un cytomètre Coulter Epics XL (Beckman Coulter). Les marquages aspécifiques ont été contrôlés par l'utilisation de contrôles isotypiques marqués. Les monocytes, lymphocytes et PNN ont été comptés à l'aide du marquage anti-CD45 associé à la détermination taille/structure des cellules. Pour chaque échantillon, 30 000 événements ont été enregistrés et les résultats absolus ont été rapportés à la détection des Flow-count™ (**Figure 43**).

B. Extraction et quantification des populations lymphocytaires des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer

Les structures lymphoïdes secondaires ont été broyées dans le RPMI et les suspensions ont été centrifugées à 700 g pendant 10 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 10 ml de RPMI puis centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Les culots obtenus ont été remis en suspension dans du RPMI (2 ml pour les plaques de Peyer et 5 ml pour les ganglions mésentériques). Les marquages avec les anticorps anti-rat monoclonaux ont été réalisés comme décrit précédemment dans des conditions saturantes. Les échantillons marqués (50 µl – 1×10^6 cellules) ont été incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 min. Du RPMI (1 ml) et des Flow-count™ (50 µl) ont été additionnés à la suspension afin de déterminer le nombre absolu de cellules par millilitre et l'analyse en cytométrie en flux a été réalisée sur un cytomètre Coulter Epics XL comme décrit précédemment. Les lymphocytes totaux ont été déterminés par le marquage anti-CD45 et la détection taille/structure. Les résultats de la détermination des lymphocytes T (CD3+) et des lymphocytes B (CD45RA+) ont été exprimés en pourcentages de lymphocytes totaux. Les lymphocytes T helper (CD3+ CD4+) et les lymphocytes T cytotoxiques (CD3+ CD8+) ont été exprimés en pourcentages de lymphocytes T totaux (CD3+).

VII. Mesures biochimiques

A. Dosage de l'activité myéloperoxydase

L'échantillon de côlon prélevé en vue du dosage de l'activité MPO a été homogénéisé mécaniquement à l'Ultra-Turrax (Ika, Staufen, Allemagne) dans un tampon phosphate 50 mM contenant 0,5% de bromure de hexadécyltriméthylammonium. L'homogénat a été soniqué 3 fois 10 s et centrifugé pendant 10 min à 3200 g à 4°C. Les surnageants ont été traités par trois cycles de congélation (dans azote liquide) / décongélation (au bain-marie à 37°C) puis centrifugés une seconde fois dans les mêmes conditions. Les surnageants (50 µl) ont été transférés dans des microcuvettes et mélangés à 1 ml de tampon phosphate 10 mM, à 500 µl d'une solution de gaïacol à 0,22% et à 10 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3 %. Après 3 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 470 nm toutes les 30 s pendant 12 min. La concentration protéique des échantillons a été déterminée à l'aide d'un kit de Pierce® au BCA (acide bicinchoninique) (Perbio, Brebières). L'activité enzymatique a été déterminée à partir de la variation de densité optique (DO) par minute à l'aide d'une MPO contrôle (Sigma) de concentration enzymatique connue. L'activité MPO a été déterminée comme la quantité d'enzyme dégradant 1 µmol d'H₂O₂ par minute et a été exprimée en unité par mg de protéines.

B. Evaluation du stress oxydant et des cytokines

Les échantillons prélevés en vue de ces dosages ont été homogénéisés mécaniquement à l'Ultra-Turrax dans un tampon Trizma 100 mM pH 7,4 contenant de l'EDTA 1mM et du fluorure de phénylméthanesulfonyl (PMSF) 1mM puis ont été préparés comme décrit précédemment.

1. Mesure des activités des enzymes antioxydantes

L'activité de la SOD a été dosée à l'aide du « SOD Assay Kit-WST » (Sigma) conformément aux instructions du fabricant. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur l'inhibition par la SOD de la réduction du Water-Soluble-Tetrazolium (WST) en WST-formazan par l'anion superoxyde produit par le système xanthine-xanthine oxydase. L'absorbance a été mesurée en point final à 450 nm. L'activité de la SOD dans chaque échantillon est exprimée en unités d'enzyme par mg de protéines.

L'activité de la CAT a été dosée à l'aide du « Catalase Assay Kit » (Sigma) conformément aux instructions du fabricant par une méthode colorimétrique indirecte basée sur le dosage du H_2O_2 restant après action de la CAT. L'absorbance a été mesurée à 520 nm.

L'activité de la CAT dans chaque échantillon est exprimée en unités d'enzyme par mg de protéines.

L'activité GPx a été dosée à l'aide du kit « Glutathione peroxidase cellular activity assay kit » (Sigma) conformément aux instructions du fabricant par une méthode colorimétrique indirecte basée sur la mesure de la diminution d'absorbance du NADPH utilisé comme cofacteur de la GR suite à l'oxydation du GSH en GSSG par la GPx. L'absorbance a été mesurée à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min. L'activité enzymatique a été déterminée à partir de la variation d'absorbance par minute à l'aide d'une GPx contrôle (Sigma) de concentration enzymatique connue. L'activité de la GPx dans chaque échantillon est exprimée en unités d'enzyme par mg de protéines.

L'activité GR a été dosée à l'aide du kit « Glutathione reductase assay kit » (Sigma) conformément aux instructions du fabricant par une méthode colorimétrique indirecte basée sur l'augmentation d'absorbance de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) lors de son oxydation par le GSH réduit par l'activité GR. L'absorbance a été mesurée à 412 nm toutes les 18 s pendant 3 min. L'activité enzymatique a été déterminée à partir de la variation d'absorbance par minute à l'aide d'une GR contrôle (Sigma) de concentration enzymatique connue. L'activité de la GR dans chaque échantillon est exprimée en unités d'enzyme par mg de protéines.

2. Dosage du glutathion

Les taux de glutathion total et réduit ont été dosés comme décrit dans la littérature (Steghens *et al.* 2003). Du dithiotréitol (50 μl) ont été additionnés à 100 μl de suspension colique dans le tampon Trizma pour le dosage du glutathion total ou à 50 μl d'eau distillée pour le dosage du glutathion réduit, puis incubés pendant 5 min à température ambiante. De l'acide métaphosphorique (850 μl) et du glutathion éthyl-ester 1mM (50 μl , standard interne) ont été additionnés aux échantillons. Les suspensions ont été centrifugées pendant 5 min à 10 000 g. Les surnageants (100 μl) ont été mélangés à 300 μl d'une solution de Na_2HPO_4 25 mM et vortexés pendant 30 s. Le mélange (50 μl) a été associé à 50 μl d'orthophthaldialdéhyde 40 mM et incubé pendant 15 min à température ambiante. Enfin, 200 μl de Na_2HPO_4 25 mM

ont été ajoutés. Les différents points de la courbe étalon de GSH ont été préparés à partir d'une solution de GSH 2000 μM diluée successivement à 1000 μM , 500 μM , 250 μM et 125 μM dans l'eau distillée et traités de la même manière que les échantillons. L'analyse a été menée par HPLC à l'aide d'un détecteur de fluorescence RF-2000 (Dionex, Jouy-en-Josas) et d'un détecteur d'absorbance AD25 (Dionex) à 350 nm. Les échantillons (10 μl) ont été injectés sur une colonne Gemini C₁₈ 5 μm (150 x 4,6 mm) (Phenomenex, Le Pecq). L'élution des composés a été réalisée avec une solution Na₂HPO₄ 25 mM pH 6,00 / acétonitrile (90 : 10) comme solvant A et une solution Na₂HPO₄ 25 mM pH 6,00 / acétonitrile (50 : 50) comme solvant B à un débit de 0,5 ml/min. Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de protéines.

3. Dosage du MDA

Les taux de MDA ont été déterminés dans les échantillons de côlon comme décrit dans la littérature (Steghens *et al.* 2001). Les homogénats de côlon (100 μl) dans le tampon Trizma ont été mélangés à 75 μl de NaCl 0,9% et à 25 μl de diaminonaphtalène 5,8 mM en solution dans du HCl 2,4 N et incubés pendant 3 h à 37°C. Les protéines ont été précipitées par addition de 100 μl d'acide métaphosphorique 10% et l'ensemble a été centrifugé pendant 3 min à 15 000 g. Les surnageants (200 μl) ont été mélangés à 70 μl de NaOH 0,5 N et à 130 μl de KH₂PO₄ 150 mM pH 2,0. Les différents points de la courbe étalon de MDA ont été préparés à partir d'une solution à 608 nM de tétraméthoxypropane diluée successivement aux concentrations de 304 nM, 152 nM et 76 nM et traités de la même manière que les échantillons. L'analyse a été réalisée par HPLC à l'aide d'un détecteur d'absorbance AD25 (Dionex) à 311 nm. Les échantillons (10 μl) ont été injectés sur une colonne HDO C₁₈ 3 μm (150 x 2 mm) protégée par une pré-colonne (HDO C₁₈ 3 μm , 10 x 2 mm) (Interchim). L'élution des composés a été réalisée avec une solution d'acétate d'ammonium 30 mM pH 2,0 / acétonitrile (89,5 : 10,5) à un débit de 0,23 ml/min. La colonne a été placée à 50°C dans un compartiment thermostaté TCC-100 (Dionex). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de protéines.

4. Dosage des cytokines

Les taux coliques d'IL-6, IL-4, IL-10, IL-1 β et TNF- α ont été mesurés par des tests classiques d'ELISA à l'aide de kits spécifiques au rat (AbCys, Paris). Les mesures ont été réalisées conformément aux instructions du fabricant. Les résultats ont été exprimés en pg/mg de protéines pour l'ensemble des cytokines sauf pour l'IL-6 dont les concentrations ont été exprimées en μ g/mg de protéines.

VIII. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica StatSoft (version 5.0, Maisons-Alfort). L'ANOVA à deux voies a été utilisée pour mesurer les effets du DSS et de l'infusé de verveine odorante ainsi que l'interaction de ces deux facteurs. Un test post-hoc LSD de Fisher a été effectué pour déterminer les différences significatives entre les groupes à la suite de l'ANOVA. Le score histologique a été analysé avec le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Mann-Whitney. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour $p < 0,05$ dans l'ensemble des analyses statistiques.

RESULTATS

Etude n°1 (Publication n°1)

***Aloysia triphylla Infusion Protects Rats against DSS-induced
Colonic Damage***

Loïc Lenoir, Juliette Joubert-Zakeyh, Odile Texier, Jean-Louis Lamaison,
Marie-Paule Vasson and Catherine Felgines.

Journal of the Science of Food and Agriculture – acceptée sous réserve de modifications.

OBJECTIF :

L'objectif de cette première étude était double : 1) déterminer les effets de la consommation préventive d'un infusé de verveine odorante sur le développement de l'inflammation colique chez le rat et 2) identifier et quantifier les métabolites urinaires des polyphénols de l'infusé de verveine odorante.

Nous avons choisi de travailler avec un infusé de verveine odorante préparé à la concentration de 40 g/l. Cette concentration est supérieure à celle préconisée par la Pharmacopée Française X^{ème} édition (Pharmacopée 2007) (10 g/l) mais permet l'extraction d'une plus grande quantité de polyphénols. La quantité de polyphénols que nous avons ainsi administrée aux rats est du même ordre de grandeur que celles rapportées dans différents travaux sur l'inflammation intestinale (Romier *et al.* 2009).

SCHEMA EXPERIMENTAL :

Trente-six rats mâles Wistar (170-200 g) ont été répartis en trois groupes de 12 individus (**Figure 44**) : un groupe contrôle (C), un groupe avec inflammation colique (DSS) et un groupe recevant l'infusé de verveine odorante plus le DSS (V-DSS). Pendant 14 jours, les rats des groupes C et DSS ont reçu de l'eau comme boisson tandis que les rats du groupe V-DSS recevaient de l'infusé de verveine à 40 g/l. Durant les 7 jours suivants, les rats des groupes DSS et V-DSS ont reçu du DSS à 4% dans leur boisson respective. Six individus de chaque groupe ont été placés individuellement dans des cages à métabolisme tout au long de l'expérimentation en vue d'étudier l'excrétion urinaire des polyphénols de l'infusé de verveine. La consommation alimentaire et le poids corporel ont été suivis tout au long de l'expérimentation. Pour les rats en cages à métabolisme, les urines de 24 h ont été recueillies le 14^{ème} jour (jour précédant l'induction de l'inflammation) et le 21^{ème} jour (dernier jour de l'expérimentation). Au 22^{ème} jour, les animaux ont été sacrifiés. Le côlon a été prélevé afin d'évaluer l'inflammation colique. Le sang, les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer ont été prélevés pour analyser et caractériser le phénotype et les mouvements des populations de cellules immunitaires au cours de la réaction inflammatoire.

RESULTATS :

I. Etude de l'excrétion urinaire des polyphénols de la verveine odorante

A. Identification des polyphénols dans l'infusé de verveine odorante

Les polyphénols ont été identifiés et quantifiés dans l'infusé de verveine odorante consommé le jour des recueils urinaires (J14 et J21). Les acides phénoliques complexes présents dans les infusés (**Figure 45.A**) sont le verbascoside (pic d) et son isomère l'isoverbascoside (pic e). Des dérivés de flavones ont été également identifiés : lutéoline 7-diglucuronide (pic a), un glycoside d'apigénine (pic b) et un glycoside de diosmétine (pic c). La nature des glycosides d'apigénine et de diosmétine n'étant pas connue et ne disposant pas de standard de lutéoline 7-diglucuronide, les flavones ont été quantifiées sous forme de génines après hydrolyse enzymatique de l'infusé (**Figure 45.B**). Les concentrations en polyphénols dans l'infusé sont rapportées dans le **Tableau 13**. Les quantités de polyphénols consommés par les rats avant (J14) et après (J21) l'administration du DSS ne diffèrent pas significativement (**Tableau 14**).

B. Analyse de l'excrétion urinaire des polyphénols de l'infusé de verveine odorante avant et après administration de DSS

Seuls les acides phénoliques complexes, verbascoside et isoverbascoside, ont été retrouvés sous forme native dans les urines des rats consommant la verveine. Les quantités excrétées ne sont pas significativement modifiées par l'inflammation. Les glycosides de flavones présents dans l'infusé ne sont pas retrouvés sous forme native dans les urines. L'hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase/sulfatase a permis l'identification et la quantification de génines de flavones. Après hydrolyse (**Figure 46**), les génines lutéoline (pic 1), apigénine (pic 2) et diosmétine (pic 4) sont retrouvées dans les urines. Nous avons également mis en évidence dans l'urine la présence de chrysoériol (pic 3), dérivé méthylé en 3' de la lutéoline. La présence d'une impureté coélue avec l'apigénine ne nous a pas permis de quantifier cette dernière. Nous avons également recherché au niveau urinaire la présence d'acides hydroxycinnamiques pouvant résulter du métabolisme des polyphénols de la verveine. Nous avons ainsi identifié de l'acide caféique mais celui-ci est coélue avec une impureté que nous n'avons pas réussi à séparer et nous n'avons donc pas pu le quantifier. Par

ailleurs, nous avons mis en évidence la présence d'acide férulique dans les urines. Cependant, cet acide hydroxycinnamique est également présent en grande quantité dans les urines des rats contrôles. L'acide férulique urinaire n'est donc pas seulement le résultat du métabolisme des polyphénols de la verveine mais vient en partie de l'alimentation.

Les quantités de polyphénols excrétés dans les urines sont rassemblées dans le **Tableau 15**. L'excrétion urinaire des polyphénols (rapportée à la quantité ingérée) n'est pas significativement modifiée par l'inflammation colique (**Tableau 16**).

II. Effets de la consommation préventive d'un infusé de verveine odorante sur le développement de l'inflammation colique chez le rat

Publication N° 1

La consommation de l'infusé de verveine ne corrige pas la diminution de la consommation alimentaire due à l'inflammation mais restaure cependant le gain de poids corporel ($p < 0,01$). Elle prévient par ailleurs le raccourcissement du côlon observé lors de l'inflammation intestinale ($p < 0,05$). Le DSS provoque de sévères altérations de la muqueuse colique telles que la destruction de l'épithélium, la dilatation des structures glandulaires ou l'apparition d'œdème dans le chorion. Ces effets sont atténués par la consommation à titre préventif de l'infusé de verveine odorante et une diminution significative du score histologique est observée ($p < 0,05$). Cependant, l'infusé ne réduit pas l'activité de la MPO stimulée par le DSS, témoignant ainsi de son absence d'effet sur l'infiltration des PNN dans la muqueuse colique.

SHORT COMMUNICATION

TITLE

***Aloysia triphylla* infusion protects rats against DSS-induced colonic damage**

RUNNING TITLE

Protection of DSS-colitis in rats *by Aloysia triphylla* infusion

AUTHOR'S NAMES

Loïc Lenoir^{a,d}, Juliette Joubert-Zakeyh^b, Odile Texier^a, Jean-Louis Lamaison^a, Marie-Paule Vasson^c, Catherine Felgines^{a*}

* Correspondence to: Dr Catherine Felgines, Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie, Faculté de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, BP 38, F-63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France. E-mail: catherine.felgines@u-clermont1.fr

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4233, Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^b CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, 63003 Clermont-Ferrand, France

^c Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4233, Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^d 3inature BIOSPHERE, Le Naturopôle, 03800 Saint-Bonnet-de-Rochefort, France

ABSTRACT

BACKGROUND: Inflammatory bowel diseases (IBD) consist of an uncontrolled intestinal inflammation leading to mucosal disruption. Polyphenols are micronutrients with antioxidative and anti-inflammatory properties and may play an interesting role in the prevention of intestinal inflammation. Lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton, Verbenaceae) infusion is a popular herbal drink rich in polyphenols. This study evaluated the protective effects of lemon verbena infusion consumption on the development of DSS-induced colitis in rats. This infusion was given to rats as a drink, providing 82 µmol

polyphenols per day for 21 days. Colitis was induced with DSS 40 g L⁻¹ in the drink for the last 7 days.

RESULTS: The lemon verbena infusion treatment restored body weight gain and prevented colonic shortening. Despite no protective effect on myeloperoxidase (MPO) activity, *Aloysia triphylla* infusion limited histological colonic alterations.

CONCLUSION: These results suggest that lemon verbena infusion partially protects rats against DSS-induced inflammation.

KEYWORDS

lemon verbena (*Aloysia triphylla*); polyphenols; dextran sodium sulfate; colitis; rats.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic uncontrolled inflammatory conditions that ultimately lead to mucosal disruption and ulceration. Although their etiology remains unclear, IBD appear to result from dysregulated immune response associated with genetic and environmental factors.¹ Various studies have underlined the potential value of herbal therapies and nutritional approaches to IBD management.^{2,3} In this context, polyphenols may play a promising role due to their anti-inflammatory activity.⁴

Aloysia triphylla (L'Herit.) Britton (Verbenaceae), better known as lemon verbena, is a herbal species widely used for food and medicinal purposes whose leaves reportedly possess digestive and antispasmodic properties⁵. Lemon verbena infusion is consumed as a treatment for colic, diarrhea and indigestion⁵ and as a hot drink. Lemon verbena infusion contains significant amounts of polyphenols, including phenolic acids (mainly verbascoside) and flavone glycosides such as luteolin-7-diglucuronide,⁶ and has a high antioxidant activity.⁷ Verbascoside reduces the severity of macroscopic and microscopic lesions and decreased proinflammatory cytokine levels in various models of murine colitis.^{8,9} The flavone luteolin reduced lipid peroxidation and increased antioxidant defenses in an experimental colon carcinogenesis model.¹⁰

Administration of dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water is widely used as an experimental model of intestinal inflammation.¹¹ Thus, this study aimed to evaluate the effects of a preventive consumption of lemon verbena infusion in nutritional conditions on DSS-induced colitis in rats. For this purpose, food consumption, body weight gain, colon length and histological lesions were determined and colonic MPO activity was assessed.

MATERIALS AND METHODS

Lemon verbena infusion

Crushed lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) leaves (40 g) (3inature Biosphère, Saint-Bonnet-de-Rochefort, France) were infused in boiled water (1 L) for 30 min. The infusion was then filtered, divided into the volumes needed per day, and stored at -20°C.

Phenolic acids (verbascoside and isoverbascoside) were quantified directly on the infusion. As flavone glycosides are not yet fully characterized, they were quantified as aglycones after enzymatic hydrolysis for 15 min at 37°C with β -glucuronidase/sulfatase (from *Helix pomatia*, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Flavones and phenolic acids were quantified by HPLC at 350 nm and 320 nm, respectively. Samples were injected onto an Uptisphere C₁₈ 5- μ m column (150 x 4.6 mm) (Interchim, Montluçon, France). Elution was performed using water/H₃PO₄ (99:1) as solvent A and acetonitrile as solvent B at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Analysis was carried out under a linear gradient from 90% A to 70% A for 40 min for flavone aglycones and from 95% A to 75% A for 40 min for phenolic acids. Flavones were quantified as luteolin, apigenin and diosmetin equivalents, and phenolic acids were quantified as verbascoside (Extrasynthèse, Genay, France).

Experimental design

Male Wistar rats (170-200 g) purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) were housed in a temperature-controlled room (22°C) with free access to diet (2016 Teklad Global standard diet, Harlan, Gannat, France) and tap water. The rats were randomized into three groups ($n = 12$ rats per group): a control group (C), a colitis group (DSS), and a verbena infusion-plus-DSS group (V-DSS). For 14 days, C and DSS rats drank tap water while V-DSS rats drank lemon verbena infusion. From day 15 to day 22, C rats were continued with tap water while DSS and V-DSS rats received 40 g L⁻¹ DSS in their drink. Animal weight, diet and beverage consumption were measured daily. At day 22, the rats were anesthetized and sacrificed by decapitation, and the colon was excised from cecum to rectum. The last distal cm was sampled for histological analysis, while the remaining mucosa was scraped, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. This study was approved by the local Ethics Committee (Reg. N° CE4-08).

Histopathological examination

Colon was fixed in alcohol-formalin-acetic acid solution and embedded in paraffin. Three 5- μ m sections were cut serially, the next three sections were cut at a distance of 100 μ m, and a

third set of sections was cut after 100 μm . All sections were stained with hematoxylin-phloxin-saffron. Histological analysis was performed in a blinded fashion. Each rat was individually scored, with each score representing the mean of nine sections. Eight parameters (epithelial and glandular destruction, cryptic colonic dilation, polymorphonuclear infiltration, mononuclear infiltration, edema, dystrophic epithelial detachment, ulceration, vascular congestion) were scored as follows: 0, normal morphology; 1, focal presence; 2, extended presence on one section and focal presence on the two others; 3, extended presence on all three levels of section. Depth of inflammation was scored as follows: 0, none; 1, limited to mucosa; 2, extended to submucosa; 3, transmural extension.

Myeloperoxidase (MPO) activity assay

Colonic mucosa samples were homogenized in ice in a 50 mmol L^{-1} phosphate buffer with 5 g L^{-1} hexadecyltrimethylammonium bromide, sonicated for 30 s in ice, and centrifuged at 3200 g for 10 min at 4°C. Supernatants were treated with three freeze-and-thaw cycles and re-centrifuged at 3200 g for 10 min at 4°C. The supernatants (50 μL) were then transferred to microcuvettes and mixed with 1 mL of 10 mmol L^{-1} phosphate buffer, 500 μL of 2.2 mL L^{-1} guaiacol and 10 μL of 0.3% H_2O_2 . After 3 min, absorbance was measured at 470 nm every 30 s for 12 min. Proteins were determined using a Pierce BCA protein assay kit (Sigma). MPO activity was defined as the quantity of enzyme degrading 1 μmol of H_2O_2 per min, expressed as units per mg proteins. The assay was performed in triplicate.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Results were analyzed by one-way ANOVA followed by an LSD Fisher test (Statistica StatSoft, Maisons-Alfort, France). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Lemon verbena infusion contained phenolic acids (verbascoside: 1.21 mmol L^{-1} and its isomer isoverbascoside: 0.46 mmol L^{-1}) and flavone derivatives (luteolin-7-diglucuronide: 0.25 mmol L^{-1} , a glycoside of apigenin: 0.042 mmol L^{-1} and a glycoside of diosmetin: 0.62 mmol L^{-1}). These results are consistent with Bilia *et al.*⁶ Since average daily lemon verbena infusion consumption was 31.6 mL, total polyphenol consumption was estimated at 81.6 $\mu\text{mol day}^{-1}$ ($\approx 47 \text{ mg day}^{-1}$).

Administration of DSS 40 g L⁻¹ for 7 days resulted in the development of colitis, as assessed macroscopically and histopathologically. Some of the rats receiving DSS gave loose stools from day 3 of the experiment. Rectal bleeding was detected in 4 DSS rats from day 5 and in 2 V-DSS rats on the last day of the experiment (data not shown). DSS administration significantly reduced food intake and body weight gain (Table 1), as previously reported.¹² Preventive lemon verbena infusion consumption did not counteract the decrease in food consumption but maintained the body weight gain. DSS colitis induced a reduction in colon length, as reported,¹² whereas lemon verbena infusion consumption prevented the colon shortening (Table 1). Similar effects of pure polyphenols or phenolic extracts have previously been observed in various colitis models.² Colon from DSS-treated rats presented epithelial destruction with glandular dilation, edema and polymorphonuclear neutrophil infiltration (Fig. 1B). Lemon verbena infusion prevented the epithelial destruction, glandular dilation and edema (Fig. 1C) and significantly reduced the severity of colonic alterations, as histological score was ≈ 1.5 -fold lower in V-DSS rats than DSS rats (Fig. 1D). MPO activity is used as a marker of mucosal inflammatory response, and is directly related to polymorphonuclear neutrophil infiltration. DSS significantly increased MPO activity (C: 3.19 ± 0.46 U mg⁻¹ proteins vs DSS: 5.19 ± 0.56 U mg⁻¹ proteins; $P < 0.05$), and lemon verbena infusion did not reduce the implication of the polymorphonuclear neutrophils in the inflammatory response (V-DSS: 6.60 ± 0.95 U mg⁻¹ proteins). Galvez *et al.*¹³ previously reported that a medicinal herbal tea (*Turnera ulmifolia*) was able to protect colonic tissue against the inflammatory response-induced damage without reducing neutrophil infiltration in the colonic mucosa. The high antioxidant activity of lemon verbena infusion⁷ may play a role in protecting the colonic mucosa, as reported elsewhere.³

CONCLUSION

This study thus concludes that lemon verbena infusion consumption limits DSS-induced colonic damage in rats. The antioxidant properties of polyphenols may play a role in this effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by 3inature BIOSPHERE.

REFERENCES

1. Sands BE, Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* **42**:16-25 (2007).
2. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A, Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* **67**:363-378 (2009).
3. Rahimi R, Mozaffari S, Abdollahi M, On the use of herbal medicines in management of inflammatory bowel diseases: a systematic review of animal and human studies. *Dig Dis Sci* **54**:471-480 (2009).
4. Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* **104**:S15-S27 (2010).
5. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanchez Mata D, Villar A, *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* **76**:201-214 (2001).
6. Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF, HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal* **46**:463-470 (2008).
7. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M, Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull* **25**:1324-1327 (2002).
8. Mazzon E, Esposito E, Di Paola R, Riccardi L, Caminiti R, Dal Toso R, Pressi G, Cuzzocrea S, Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **380**:79-94 (2009).
9. Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G, *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* **148**:373-381 (2007).
10. Ashokkumar P, Sudhandiran G, Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* **62**:590-597 (2008).
11. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, Kirk S, Gardiner K, The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp Clin Pathol* **19**:235-239 (2010).

12. Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R, Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* **44**:1458-1475 (1999).
13. Galvez J, de Souza Gracioso J, Camuesco D, Vilegas W, Monteiro Souza Brito AR, Zarzuelo A, Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia* **77**:515-520 (2006).

Table 1. Food intake, body weight gain and colon length

Group	Food intake (g)	Body weight gain (%)	Colon length (cm)
C	195 ± 6.4	5.01 ± 0.50	17.1 ± 0.40
DSS	174 ± 4.9**	3.36 ± 0.38*	15.1 ± 0.44**
V-DSS	178 ± 5.2	5.53 ± 0.59 ^{††}	16.5 ± 0.37 [†]

Values are means ± SEM ($n = 12$). C, control group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. * $P < 0.05$ vs C group, ** $P < 0.01$ vs C group, [†] $P < 0.05$ vs DSS group, ^{††} $P < 0.01$ vs DSS group (one way ANOVA, LSD Fisher test). Food intake and body weight gain correspond to the final week of the experiment.

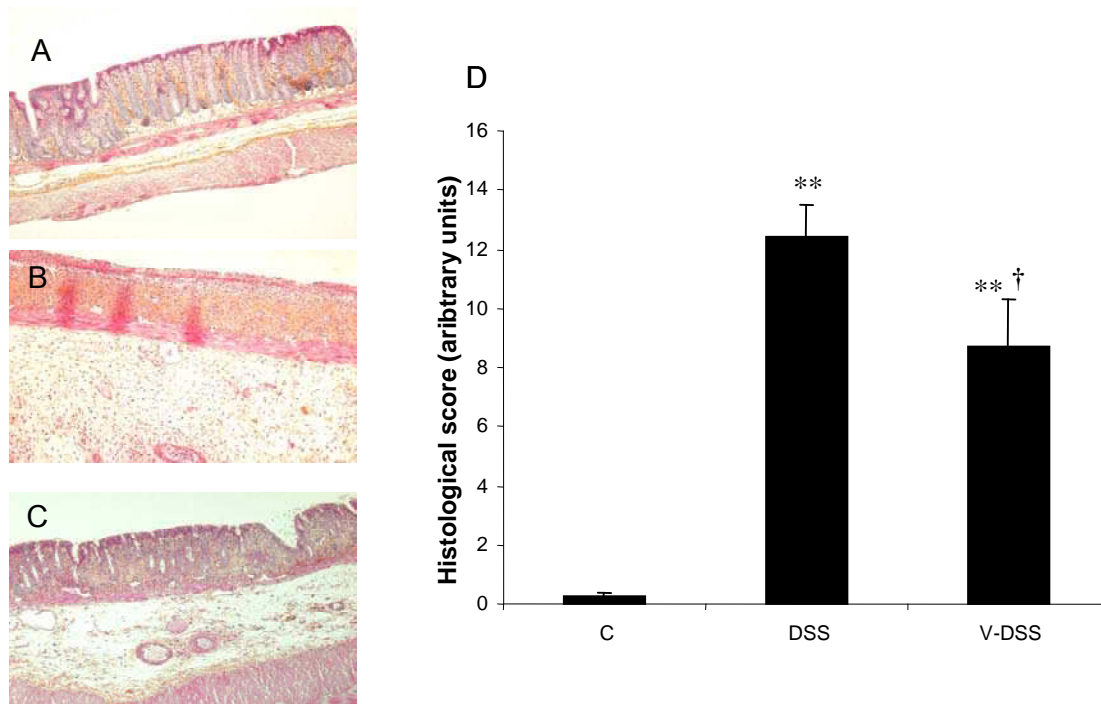


Figure 1. Histological analysis of colonic mucosa: resection of control (A) colons showed normal mucosa with intact epithelial surface whereas DSS-induced colitis rats (B) presented massive epithelial and glandular destruction, polymorphonuclear infiltration, ulceration and submucosal inflammation. Lemon verbena infusion consumption (C) protected mucosa against epithelial and glandular destruction. Histological score (D): values are means \pm SEM ($n = 12$). C, control group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. ** $P < 0.01$ \underline{vs} C group, $^{\dagger} P < 0.05$ \underline{vs} DSS group (one way ANOVA, LSD Fischer test).

III. Résultats complémentaires

A. Leucocytes sanguins et lymphocytes des structures lymphoïdes secondaires

Les données concernant les populations cellulaires sanguines sont rassemblées dans le **Tableau 17**. Chez les rats enflammés, la consommation de l'infusé de verveine odorante induit une augmentation significative du nombre de lymphocytes circulants se traduisant par une augmentation du nombre de leucocytes. L'analyse des sous-populations lymphocytaires montre que la verveine induit une augmentation significative du nombre de lymphocytes T et de lymphocytes B comparativement au groupe DSS ($p < 0,05$) mais également au groupe C en ce qui concerne les lymphocytes B ($p < 0,05$). L'analyse en triple marquage des lymphocytes T met en évidence une augmentation des lymphocytes T CD8+ suite à la consommation de verveine comparativement au groupe DSS ($p < 0,01$) et au groupe C ($p < 0,05$).

Les modifications des populations cellulaires s'observent également dans les structures lymphoïdes secondaires associées à l'intestin (**Tableau 18**). Dans les plaques de Peyer, le DSS diminue la proportion de lymphocytes B comparativement au groupe C ($p < 0,01$). Cette diminution des lymphocytes B est également observée dans le groupe V-DSS mais de manière moins marquée ($p < 0,05$). Dans les ganglions mésentériques, la proportion de lymphocytes B est également diminuée dans les groupes DSS et V-DSS (*vs* C, $p < 0,05$). De plus, le DSS augmente la proportion de lymphocytes T CD4+ (*vs* C, $p < 0,05$), cette augmentation étant corrigée par la consommation de l'infusé de verveine (*vs* DSS, $p < 0,01$). La proportion de lymphocytes T CD8+ est, quant à elle, diminuée par le DSS (*vs* C, $p < 0,01$) et corrigée dans le groupe V-DSS (*vs* DSS, $p < 0,01$).

B. Activité de la SOD et de la GPx dans la muqueuse colique

La SOD et la GPx ont été déterminées sur la muqueuse colique pour 6 rats de chaque groupe (**Figure 47**). L'activité SOD, enzyme antioxydante, est significativement diminuée dans le côlon des rats recevant le DSS comparativement aux rats contrôles ($p < 0,01$). La consommation de l'infusé de verveine odorante ne corrige pas la diminution d'activité induite

par le DSS (vs C, $p < 0,05$). Le DSS et la consommation de l'infusé n'ont pas d'effet significatif sur l'activité GPx.

CONCLUSION

L'excrétion urinaire des acides phénoliques complexes et des flavones n'est pas modifiée par l'inflammation colique.

Par ailleurs, la consommation à titre préventif de l'infusé de verveine odorante exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation colique, effet observé sur les marqueurs cliniques de l'inflammation mais également au niveau des altérations de la muqueuse colique. Bien que la verveine odorante ne limite pas la colonisation du tissu colique par les cellules de l'immunité innée (PNN), elle pourrait moduler les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T CD8+) impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire.

Etude n°2 (Publication n°2)

***Lemon Verbena Tea Consumption Attenuates
Oxidative Stress in Dextran Sulfate Sodium-Induced
Colitis in the Rat***

Loïc Lenoir, Adrien Rossary, Juliette Joubert-Zakeyh, Juliette Vergnaud-Gauduchon,
Marie-Chantal Farges, Didier Fraisse, Odile Texier, Jean-Louis Lamaison,
Marie-Paule Vasson and Catherine Felgines.

Digestive Diseases and Sciences – acceptée.

OBJECTIF :

Dans l'étude précédente, nous avons montré que la consommation régulière de l'infusé de verveine odorante protège partiellement la muqueuse intestinale des altérations induites par l'inflammation colique. Cependant, nous n'avons pas montré d'effet bénéfique sur la MPO, marqueur d'inflammation. Nous avons envisagé l'effet d'une trop forte concentration en polyphénols afin d'expliquer ce phénomène. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité MPO observée en situation inflammatoire et l'infiltration de la muqueuse par les PNN peuvent être associés à une augmentation des EROs conduisant à un stress oxydatif dans les tissus. Ainsi, l'objectif de cette deuxième étude est d'explorer l'effet d'une plus faible consommation de polyphénols de verveine odorante sur l'inflammation intestinale et les paramètres du stress oxydant. Nous nous sommes ainsi intéressés aux paramètres classiques de l'inflammation intestinale (atteintes histologiques, MPO), au phénotypage des populations immunitaires impliquées ainsi qu'aux altérations oxydatives et aux défenses antioxydantes.

SCHEMA EXPERIMENTAL :

Afin de conserver le rapport drogue végétale/eau que nous avons eu lors de la préparation de l'infusé dans l'Etude n°1 mais de diminuer la quantité de polyphénols administrés aux rats, l'infusé a été préparé dans les mêmes conditions que précédemment (40 g de poudre infusés dans 1 l d'eau bouillante pendant 30 min) puis dilué au dixième (« infusé à 4g/l »).

Vingt-quatre rats mâles Wistar (170-200 g) ont été répartis en quatre groupes : contrôle (C), verveine (V), enflammé (DSS) et verveine enflammé (V-DSS) (**Figure 48**). Pendant 14 jours, les rats des groupes V et V-DSS ont reçu comme boisson l'infusé de verveine tandis que les autres rats ont reçu de l'eau. Au cours des 7 derniers jours de l'expérimentation, les animaux des groupes DSS et V-DSS ont reçu du DSS à 4% dilué dans leur boisson. A J21, les animaux ont été sacrifiés et les côlons prélevés pour l'analyse des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant. Les ganglions mésentériques, les plaques de Peyer et le sang ont été traités en vue du phénotypage des populations immunitaires.

RESULTATS :

Malgré des effets peu marqués de l'agent inflammatoire sur les paramètres tels que la consommation alimentaire, la prise de poids et la longueur du côlon, la consommation de l'infusé de verveine odorante faiblement dosé tend à maintenir ces paramètres proches de

ceux des rats contrôles. Elle ne permet pas cependant de limiter les atteintes histologiques et l'augmentation de l'activité MPO significativement augmentées par le DSS. L'étude des paramètres du stress oxydant montre que l'infusé de verveine faiblement dosé stimule l'activité de la SOD au cours de l'inflammation ($p < 0,05$) et réduit fortement la peroxydation lipidique ($p < 0,01$). La consommation de DSS modifie certaines populations lymphocytaires dans les plaques de Peyer (diminution des cellules CD4+ et augmentation des cellules CD8+ ; $p < 0,05$) mais ces modifications ne sont pas contrecarrées par la consommation de verveine.

CONCLUSION :

Ces résultats montrent que malgré l'absence de protection vis-à-vis des altérations de la muqueuse colique, la consommation préventive d'infusé de verveine odorante dilué pourrait jouer un rôle dans la protection contre le stress oxydant en stimulant la SOD et réduisant la peroxydation lipidique.

Lemon Verbena Infusion Consumption Attenuates Oxidative Stress in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in the Rat

Loïc Lenoir (PhD) - Adrien Rossary (PharmD, PhD) - Juliette Joubert-Zakeyh (MD) - Juliette Vergnaud-Gauduchon (PharmD, PhD) – Marie-Chantal Farges (PhD) - Didier Fraisse - Odile Texier (PharmD, PhD) – Jean-Louis Lamaison (PharmD, PhD) - Marie-Paule Vasson (PharmD, PhD) - Catherine Felgines (PharmD, PhD)

Postal addresses:

L. Lenoir – D. Fraisse – O. Texier – J.L. Lamaison – C. Felgines

Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4233, Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

A. Rossary – J. Vergnaud-Gauduchon – MC. Farges – MP. Vasson

Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4233, Laboratoire de Biochimie Biologie Moléculaire et Nutrition, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

J. Joubert-Zakeyh

CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, F-63003 Clermont-Ferrand, France

L. Lenoir

Biosphere 99, ZI Les Tiolans, F-03800 Saint-Bonnet-de-Rochefort, France

E-mail addresses:

loic.lenoir@u-clermont1.fr; adrien.rossary@u-clermont1.fr; jjoubert@chu-clermontferrand.fr; juliette.vergnaud@u-psud.fr; m-chantal.farges@u-clermont1.fr; didier.fraisse@u-clermont1.fr; odile.texier@u-clermont1.fr; j-louis.lamaison@u-clermont1.fr; m-paule.vasson@u-clermont1.fr; catherine.felgines@u-clermont1.fr

Corresponding author: Dr Catherine Felgines

Laboratoire de Pharmacognosie et de Phytothérapie, Faculté de pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

e-mail: catherine.felgines@u-clermont1.fr

Acknowledgments: This work was funding by Biosphere 99.

Abstract:

Background Inflammatory bowel diseases (IBD) consist of an uncontrolled intestinal inflammation leading to mucosal disruption. This inflammation is accompanied by an excessive production of reactive oxygen species (ROS). Polyphenols are micronutrients with antioxidative and anti-inflammatory properties and may play an interesting role in the prevention of intestinal inflammation. Lemon verbena (*Aloysia triphylla*) infusion is a popular herbal infusion rich in polyphenols (flavones and verbascoside).

Aims This study evaluated the preventive effects of lemon verbena infusion consumption against mild-to-moderate dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in rats.

Methods Wistar rats drank water or lemon verbena infusion for 14 days. On day 15, half of the rats received DSS (4%) in their drink for 7 days. At the end of the experimental period, colon was taken for histopathological examination and determination of myeloperoxidase (MPO) activity, antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT)), glutathione and lipid peroxidation. Lymphocyte populations were determined in blood, mesenteric nodes and Peyer's patches.

Results Rats ingested daily 5.6 μmol polyphenols. DSS reduced food intake and induced colitis as reflected by histological lesions and increased MPO activity. Although these alterations were not significantly counteracted by lemon verbena consumption, the herbal infusion increased colonic SOD activity and decreased lipid peroxidation (malondialdehyde). Other oxidative stress markers (GPx, GR, CAT, glutathione) were not significantly modified.

Conclusion Our study shows that preventive consumption of lemon verbena infusion offered some antioxidative protection during experimental colitis by stimulating SOD activity and decreasing lipid peroxidation.

Keywords: Lemon verbena - Polyphenols - Dextran sodium sulfate - Colitis - Oxidative stress - Rat

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD), which include Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic pathologies consisting of an uncontrolled inflammation that ultimately leads to mucosal disruption and ulceration. At the present time, their aetiology remains unclear, and they appear to result from a dysregulated immune response associated with genetic and environmental factors [1]. During the inflammatory process, a high number of immunological cells, including activated macrophages, polymorphonuclear neutrophils and eosinophils, infiltrate the *lamina propria* of the gut [2] and produce a large amount of reactive oxygen species (ROS) [2, 3]. Oxidative damage is exacerbated by the depletion of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses accompanying the inflammatory process [4, 5].

Various studies have underlined the interest of nutritional approaches to IBD management [6-8]. Polyphenols are micronutrients widely distributed in fruits and vegetables, and may play a promising role in this context. Indeed, these micronutrients have been shown to possess anti-inflammatory activity [9]. Moreover, it is now well known that a large fraction of polyphenol glycosides reaches the colon where they could be metabolized by colonic microflora [10]. Polyphenols and their metabolites could thus exert beneficial effects at this level. Indeed, studies on rodent models of colitis indicated that polyphenols may prevent intestinal inflammation and injury [11]. Polyphenols reduce colonic and extra-colonic signs of disease, colon macropathology, and indices of inflammation and autoimmunity (e.g. colonic myeloperoxidase (MPO) activity, cytokine levels and tissue neutrophil infiltration) [12].

Various popular herbal infusions contain significant amounts of polyphenols [13]. *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton, better known as lemon verbena is widely used for food and medicinal purposes. Lemon verbena leaves are reported to possess digestive and antispasmodic properties, and lemon verbena infusions are traditionally taken as a treatment for colic, diarrhoea and indigestion [14]. Lemon verbena infusion has a high antioxidant activity, with the ability to scavenge superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radicals (OH^{\bullet}) and hypochlorous acid (HOCl) [15, 16]. Moreover, the anti-genotoxic effect of lemon verbena was highlighted in an *in vivo* model of acrylamide-induced DNA damage [17]. These beneficial effects are mainly attributed to polyphenols. Chemical analysis of *A. triphylla* infusion has identified its major polyphenols as phenolic acids (such as verbascoside) and flavone glycosides (such as luteolin 7-diglucuronide) [16, 18]. Such compounds have been shown to possess anti-inflammatory effects in models of induced colitis. For instance, verbascoside reduced the severity of macroscopic and microscopic lesions and decreased proinflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β) in various models of murine colitis [19, 20].

The flavone luteolin was tested as a treatment of cancer in an experimental colon carcinogenesis model and was demonstrated to reduce lipid peroxidation and increase enzymatic antioxidant activities (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR)) and non-enzymatic antioxidants (glutathione (GSH)) [21]. However, to date the anti-inflammatory effects of a regular consumption of lemon verbena infusion have not been evaluated.

Considering these elements, the present study aimed to evaluate for the first time the effects of a preventive consumption of lemon verbena infusion against the development of mild-to-moderate colonic inflammation induced by dextran sulfate sodium (DSS) in the rat. The severity of colitis was assessed by measuring food consumption, body weight gain and determining histological lesions and MPO activity. The phenotype of blood leukocytes and the lymphocyte subsets in gut-associated lymphoid tissue (GALT), including mesenteric lymph nodes and Peyer's patches, were determined. Oxidative stress was evaluated in the colon by analysis of malondialdehyde (MDA) and GSH levels and antioxidative enzyme activities.

Materials and methods

Chemicals

Verbascoside, luteolin, apigenin and diosmetin standards were from Extrasynthèse (Genay, France). DSS (molecular wt 38,000-48,000) was purchased from TdB Consultancy AB (Uppsala, Sweden). Sodium pentobarbital was from Ceva Santé Animale (Libourne, France). Pierce BCA protein assay kit was supplied from Perbio (Brebrières, France). All antibodies and isotype controls were from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont-de-Claix, France). IOTest®3, VersaLyse™ Lysing solution and Flow-Count™ fluorospheres were from Beckman Coulter (Roissy, France). TNF- α and IL-6 ELISA kits were supplied by AbCys (Paris, France). All other chemicals and antioxidant enzyme kits were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Lemon Verbena Infusion Preparation

Crushed lemon verbena leaves (40 g) (Biosphère 99, Saint-Bonnet-de-Rochefort, France) were infused in boiled water (1 liter) for 30 min in order to enhance polyphenol extraction. The infusion was then filtered, diluted ten times with tap water, divided up accordingly to the volume needed per day, and stored at -20°C.

HPLC Analysis of Lemon Verbena Infusion

The lemon verbena infusion was analyzed by HPLC to determine the amount of polyphenols (glycosides of flavones and phenolic acids). Phenolic acids (verbascoside and isoverbascoside) were quantified directly on infusion diluted 10-fold in water. Since the flavone glycosides found in lemon verbena infusion have not yet been fully characterized, they were quantified as aglycones after enzymatic hydrolysis. We have previously controlled that such hydrolysis was complete (data not shown). Infusion samples were diluted 5-fold in water, incubated for 15 min at 37°C with 6×10^6 U/l β -glucuronidase plus 5×10^4 U/l sulfatase (from *Helix pomatia*), then treated by adding 2.4 volumes of acetone. The resulting mixture was centrifuged for 5 min at 4,500 g at room temperature. The supernatant was evaporated under a helium stream to the initial volume of infusion and diluted 2-fold in ethanol. Flavones and phenolic acids were analyzed by HPLC using a DAD 200 photodiode array detector (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) and a 785A UV-vis detector (Perkin-Elmer) at 350 nm and 320 nm, respectively. Samples (20 μ l) were injected onto an Uptisphere C₁₈ 5- μ m column (150 x 4.6 mm) protected by a guard column (Uptisphere C₁₈ 5- μ m, 10 x 4 mm) (Interchim, Montluçon, France). Elution was performed using water/H₃PO₄ (99:1) as solvent A and acetonitrile as solvent B at a flow rate of 1.0 ml/min. Analysis was carried out with linear gradient conditions from 95% A to 75% A for 40 min for flavone glycosides and phenolic acids and from 90% A to 70% A for 40 min for flavone aglycones. Flavones were quantified as luteolin, apigenin and diosmetin equivalents. Phenolic acids were quantified as verbascoside. The assays were performed in triplicate.

Animals

Twenty-four male Wistar rats weighing 170-200 g were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed in a temperature-controlled room (22°C) with a controlled 12-h light/dark cycle. The rats were given free access to diet (2016 Teklad Global standard diet, Harlan, Gannat, France) and tap water. They were allowed to adapt to the Auvergne University Experimental Animal Laboratory for one week before beginning the experiment. This animal study was approved by the local Ethics Committee.

Experimental Design

Rats were randomly divided into four groups (6 rats per group): a control group (C), a colitis group (DSS), a verbena infusion group (V) and a verbena infusion-plus-DSS group (V-DSS). During 14 days, C and DSS rats drank tap water while V and V-DSS rats drank verbena

infusion. From day 15 to day 22, C and V were rats kept on drinking tap water and verbena infusion, respectively, while DSS and V-DSS rats received 4% DSS in their drink. Animal weight, diet and beverage consumption were measured daily. Body weight gain was determined between day 15 and day 22 and expressed as a percentage of day 15 body weight. Food intake was expressed as the sum of food consumed during the 7 days of colitis induction. At day 22, after an overnight fast, rats were anaesthetized by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (40 mg/kg body weight) and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected in EDTA-coated tubes and immediately treated for cellular blood determination. Mesenteric lymph nodes and Peyer's patches were harvested and placed in RPMI medium under slow rotation until further analysis. The colon was excised from the caecum to the rectum then freed of adherent adipose tissue, and its length was measured under a constant load (2 g). The last distal cm was sampled for histological analysis and the remaining portion was longitudinally divided into four sections, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

Histopathological Examination

The section for histological examination was fixed in alcohol-formalin-acetic acid solution and embedded in paraffin. Three 5 µm sections were cut serially. The next three sections were cut at a distance of 100 µm. A third set of sections was then cut after 100 µm. All sections were stained with haematoxylin-eosin-safran and evaluated. Histological analysis was performed in a blinded fashion. Rats were scored individually. Each score represented the mean of nine sections. Eight separate parameters were scored as follows: 0, normal morphology; 1, focal determination; 2, extended determination on one section and focal determination on the two others; 3, extended determination on all three sections. The parameters considered were epithelium and glandular destruction, cryptic dilatation, polymorphonuclear infiltration, mononuclear infiltration, oedema, dystrophic epithelium detachment, ulceration and vascular congestion. Depth of inflammation was scored as follows: 0, none; 1, limited to mucosa; 2, extended to submucosa; 3, transmural extension.

MPO Activity Assay

A section of colonic samples was mechanically homogenized in ice with a T25 Ultra-Turrax system (IKA, Staufen, Germany) in a 50 mM phosphate buffer with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HBAT). The homogenate was sonicated for 30 s in ice and centrifuged for 10 min at 3,200 g at 4°C. Supernatants were treated with three freeze-

and-thaw cycles and then re-centrifuged for 10 min at 3,200 *g* at 4°C. Supernatants (50 µl) were transferred to microcuvettes and mixed with 1 ml of 10 mM phosphate buffer, 500 µl of 0.22% guaiacol and 10 µl of 0.3% H₂O₂. After 3 min, absorbance was measured at 470 nm every 30 s during 12 min. Protein concentration of the supernatants was determined using a Pierce BCA protein assay kit. MPO activity was defined as the quantity of enzyme degrading 1 µmol of H₂O₂ per min and was expressed as units per mg of proteins. The assay was performed in triplicate.

Blood Determinations

Whole blood (25 µl – 1x10³ leukocytes) cells were stained using immunofluorescence techniques. Anti-rat monoclonal antibody (anti-CD45: common leukocyte antigen, OX-1, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated) was used at saturating concentrations to detect total leukocytes. The samples were incubated at room temperature in the dark for 15 min. Samples were fixed with 0.1% formaldehyde (IOtest®3), and red blood cells were lysed by addition of 1 ml VersaLyse™ lysing solution. Flow-Count™ fluorospheres (25 µl) were added to determine absolute number (per ml) of cells, and flow cytometry was performed using a Coulter Epics XL flow cytometry system (Beckman Coulter, Roissy, France). Non-specific staining was controlled by labelled isotype controls. Monocytes, lymphocytes and polymorphonuclear cells were counted using both anti-CD45 staining and size scatter-forward scatter plot. For each sample, 30,000 events were recorded, and absolute results were determined in comparison with Flow-Count™ detection.

Isolation of Lymphocyte Populations from Mesenteric Lymph Nodes and Peyer's Patches

Lymphocyte suspensions were obtained from mesenteric lymph nodes and Peyer's patches by crushing in RPMI. Lymphocytes were pelleted by centrifugation at 700 *g* for 10 min at 4°C, resuspended in 10 ml of RPMI and re-pelleted in the same conditions. The lymphocytes were then resuspended in RPMI (2 ml for Peyer's patches and 5 ml for mesenteric lymph nodes). Anti-rat monoclonal antibodies used to detect different lymphocyte subsets were as follows: anti-CD45 (OX-1, FITC-conjugated) for leukocytes, anti-CD45RA (OX-33, phycoerythrin (PE)-conjugated) for B-cells, anti-CD3 (1F4, PE-conjugated) for T-lymphocytes, anti-CD4 (OX-35, phycoerythrin cyanin 5 (PE-Cy5)-conjugated) for T-helper (T_h) lymphocytes, and anti-CD8a (OX-8, FITC-conjugated) for T-cytotoxic (T_c) lymphocytes. All antibodies were used at saturating concentrations. Stained samples (50 µl – 1 x 10⁶ cells) were incubated at room temperature in the dark for 15 min. RPMI (1 ml) and Flow-Count™ fluorospheres (50

μl) were added to determine absolute number (per ml) of cells, and flow cytometry was performed using a Coulter Epics XL flow cytometry system (Beckman Coulter) as described above. Total lymphocytes were counted using both anti-CD45 staining and size scatter-forward scatter plot. Results for T (CD3+) and B (CD45RA+) lymphocytes were expressed as percentages of total lymphocytes. T-helper lymphocytes (CD3+ CD4+) and T-cytotoxic lymphocytes (CD3+ CD8+) were expressed as percentages of total T-lymphocytes.

Determination of Colonic Antioxidant Enzyme Activities and Cytokines

A section of colonic samples was mechanically homogenized in ice using a T25 Ultra-Turrax system (IKA) in a 100 mM Trizma buffer pH 7.4 with 1 mM EDTA and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and treated as described above. Supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further analysis. Antioxidant enzyme activities were determined in triplicate using a SOD determination kit, a GR assay kit, a GPx cellular activity assay kit, and a CAT assay kit. Protein concentration of the supernatants was determined using a Pierce BCA protein assay kit. Activities were defined as the quantity of enzyme degrading 1 μmol of substrate per min and were expressed in units per mg of proteins. TNF-α and IL-6 levels were quantified in the supernatants by standard cytokine-specific rat ELISA kits and expressed in pg or μg per mg of proteins, respectively. The assays were performed in duplicate.

Determination of Glutathione Content

Total glutathione and reduced glutathione contents were measured as described in Steghens *et al.* [22]. Briefly, 100 μl of the colonic homogenate in Trizma buffer were mixed with 50 μl dithiothreitol for the total glutathione assay or with 50 μl distilled water for the reduced glutathione determination, and then incubated for 5 min at room temperature. Then, 850 μl of metaphosphoric acid and 50 μl of 1 mM glutathione ethyl ester (internal standard) were added to samples. Mixtures were centrifuged for 5 min at 10,000 g. Then, 100 μl of supernatant was mixed with 300 μl of a 25 mM Na₂HPO₄ buffer and vortexed for 30 s. The mixture (50 μl) was mixed with 50 μl of 40 mM orthophthaldialdehyde and incubated for 15 min at room temperature. Finally, 200 μl of 25 mM Na₂HPO₄ were added. GSH standard curve was prepared with a glutathione solution (2000 μM) diluted in distilled water and treated as per the supernatants. Analysis was carried out by HPLC using a RF-2000 fluorescence detector (Dionex, Jouy-en-Josas, France) and an AD25 absorbance detector (Dionex) at 350 nm. Samples (10 μl) were injected onto a Gemini C₁₈ 5-μm column (150 x 4.6 mm) (Phenomenex,

Le Pecq, France). Elution was performed using 25 mM Na₂HPO₄ pH 6.00/acetonitrile (90:10) as solvent A and 25 mM Na₂HPO₄ pH 6.00/acetonitrile (50:50) as solvent B at a flow rate of 0.5 ml/min. Results were expressed as µmol/g of proteins. The assay was performed in duplicate.

Colonic MDA Determination

MDA amount was determined in colonic samples as described in Steghens *et al.* [23]. Briefly, 100 µl of colonic homogenate in Trizma buffer was mixed with 75 µl of 0.9% NaCl and 25 µl of 5.8 mM diaminonaphthalene in 2.4 N HCl and incubated for 180 min at 37°C. Then, proteins were precipitated by addition of 100 µl of 10% metaphosphoric acid and centrifuged for 3 min at 15,000 g. Supernatants (200 µl) were mixed with 70 µl of 0.5 N NaOH and 130 µl of 150 mM KH₂PO₄ pH 2.0. MDA standard curve was prepared with a tetramethoxypropane solution (608 nM) diluted in water and treated as per the supernatants. Analysis was carried out by HPLC using an AD25 absorbance detector (Dionex) at 311 nm. Samples (10 µl) were injected onto a HDO C₁₈ 3-µm column (150 x 2 mm) protected by a guard column (HDO C₁₈ 3-µm, 10 x 2 mm) (Interchim). Elution was performed using acetonitrile/30 mM-ammonium acetate pH 2.0 (10.5:89.5) at a flow rate of 0.23 ml/min. The column was kept at 50°C in a thermostatted column compartment TCC-100 (Dionex). MDA amounts were expressed as µmol/g of proteins. The assay was performed in duplicate.

Statistical Analysis

Results are expressed as means with their standard errors. Data analysis was performed using the Statistica StatSoft software programme (version 5.0, Maisons-Alfort, France). Two-way ANOVA was carried out to assess the effects of DSS (DSS), verbena infusion consumption (V) and their interaction (DSS*V). Each was tested at the 0.05 level of significance. ANOVA was followed by an LSD-Fisher test to determine significant differences between groups at a level of $P < 0.05$. Histological score was analyzed with a non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by a Mann-Whitney test to determine significant differences at a level of $P < 0.05$.

Results

Lemon Verbena Infusion Polyphenols

As shown in Fig. 1(a), phenolic acids identified in the lemon verbena infusion were verbascoside (peak d) and an isomer of verbascoside identified as isoverbascoside (peak e).

Flavone derivatives were also identified: luteolin 7-diglucuronide (peak a), a glycoside of apigenin (peak b) and a glycoside of diosmetin (peak c).

Lemon verbena infusion contained 66.2 μM of verbascoside and 21.5 μM of isoverbascoside. After enzymatic hydrolysis (Fig. 1(b)), three flavones were quantified: luteolin (peak a, 25.2 μM), apigenin (peak b, 3.7 μM) and diosmetin (peak c, 69.6 μM). Since the average daily consumption of infusion was 29.7 ml, animals thus ingested 1.97 $\mu\text{mol/day}$ verbascoside, 0.64 $\mu\text{mol/day}$ isoverbascoside, 2.1 $\mu\text{mol/day}$ diosmetin, 0.75 $\mu\text{mol/day}$ luteolin and 0.11 $\mu\text{mol/day}$ apigenin. Total polyphenol consumption was thus 5.57 $\mu\text{mol/day}$.

Food Intake, Body Weight Gain and Colon Length

Food intake, body weight gain and colon length are reported in Table 1. During the last week of the experiment, DSS rats ate significantly less than control rats. Body weight gain and colon length were not significantly affected by DSS or verbena treatment. Loose stools and rectal bleeding were only observed in some DSS-treated rats from the last two days of the experiment. Beverage consumption was followed up throughout the experiment, and did not differ between groups (data not shown).

Histopathological Examinations

The colon of rats receiving DSS (DSS and V-DSS groups, Fig. 2(c) and (d)) presented epithelium destruction, polymorphonuclear infiltration and oedema throughout the mucosa and sub-mucosa compared to normal tissue sections (C and V groups, Fig. 2(a) and (b)). Histopathological score (Fig. 3) was markedly increased in inflamed rats (DSS and V-DSS groups) compared to other groups ($P < 0.05$). The consumption of lemon verbena infusion did not improve the histopathological score induced by DSS.

Blood Cells and Lymphocytes of Immunological Secondary Structures

As shown in Table 2, DSS significantly increased blood polymorphonuclear cells ($P_{\text{DSS}} = 0.04$). In Peyer's patches of rats consuming verbena infusion or DSS, the percentage of B lymphocytes was significantly reduced. Moreover, DSS consumption significantly decreased percentage of T_h and increased percentage of T_c . There was no significant effect of verbena infusion consumption on these subpopulations. In the mesenteric lymph nodes, percentages of lymphocyte subpopulations were not significantly modified, except for an increase in T_c cell percentage in rats drinking verbena infusion ($P_V = 0.04$, data not shown).

Colonic MPO Activity

MPO activity, as a marker of inflammation, was significantly increased in the colitis group (DSS) compared to controls (Fig. 4). MPO activity in the V-DSS group was not significantly different from other groups.

Colonic Antioxidant Enzyme Activities and Glutathione Content

Table 3 summarizes the antioxidant enzyme activities recorded. SOD activity was not significantly modified in the colitis group (DSS) compared to the control group. However, lemon verbena infusion consumption induced a significant increase of SOD activity in V-DSS rats *vs* DSS rats ($P < 0.05$). CAT, GPx and GR activities were not significantly different between groups. DSS and/or lemon verbena infusion consumption did not modify total or reduced glutathione contents (Fig. 5).

Colonic Cytokines Levels

Table 4 summarizes colonic TNF- α and IL-6 concentrations. DSS and/or lemon verbena infusion did not significantly affect cytokines levels.

Colonic MDA Content

Induction of colitis by DSS did not affect MDA content in the colon (Fig. 6). However, lemon verbena infusion consumption decreased colonic MDA content in both inflamed and non-inflamed rats (C *vs* V and DSS *vs* V-DSS, $P < 0.05$).

Discussion

Several recent experimental studies have underlined the interest of polyphenol consumption in the modulation of intestinal inflammation. Most of these studies have been carried out with purified molecules, while only a few have examined the effects of polyphenol-rich foods or beverages [11]. In this study, we evaluated the preventive effects of a polyphenol-rich herbal infusion (lemon verbena) against mild-to-moderate colonic inflammation. Lemon verbena infusion is an aqueous extract containing various polyphenolics such as flavones and verbascoside [16, 18]. Consumption of lemon verbena infusion by rats (5.6 μmol polyphenols per day) corresponds to an equivalent human intake of about 63 mg of polyphenols per day. Such an amount could be easily reached since polyphenol consumption in humans is currently estimated at ≈ 1 g/day [24]. Colitis induced by daily oral administration of DSS is one of the most widely used models for IBD. DSS causes injury mainly in the distal colon [25], and

lesions are accompanied by mucosal infiltration of neutrophils [26]. Although the exact mechanism of action of DSS is not fully understood, it has been shown that DSS increases colonic mucosal permeability, leading to destruction of the mucosal barrier function and inflammatory reactions [27]. The conditions of DSS administration (4% for 7 days) were chosen to induce a mild-to-moderate colitis that could be more amenable to nutritional prevention. However, this resulted in a somewhat high variability in the magnitude of colitis and in some non-significant variations [28, 29].

In these conditions, DSS significantly reduced food intake and slightly decreased body weight gain and colon length. Lemon verbena infusion consumption in DSS-treated rats kept these parameters close to control values. The protective effects of pure polyphenols or polyphenol-rich extracts on animal growth and colon length have been previously observed in colitic rats [11, 30]. Histological examination of colon samples from DSS-treated rats showed epithelium destruction with glandular dilatation, edema and polymorphonuclear infiltration, as previously reported [20, 31, 32]. These alterations were not corrected by lemon verbena infusion consumption. Nevertheless, beneficial effects of various polyphenols on colonic histological structure have often been reported. Purified verbascoside improved the histopathological lesions induced by intrarectal administration of 2,4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) [19], while diet supplementation with resveratrol or curcumin also decreased mucosal erosion in trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and DSS models [31, 33, 34]. Conversely, histological score worsened in a DSS mouse model after diet supplementation with a high dose of luteolin (32 mg/mouse/day) [35].

MPO is used as a marker of inflammatory response in the mucosa, and its activity in the colon is linearly related to neutrophil infiltration [36]. DSS-induced inflammation resulted in an increase of colonic MPO activity that was not prevented by lemon verbena infusion consumption (≈ 9 mg/kg/day polyphenols). This neutrophil mobilization could be related to the effect of DSS on blood polymorphonuclear cell numbers. A recent study reported a protective effect of verbascoside administered *per os* (0.2 and 2 mg/kg) on MPO activity in rats with DNBS-induced colitis [19]. Moreover, i.p.-injected verbascoside (≈ 30 mg/kg/day) in mice failed to reduce MPO activity in acute DSS-induced colitis but reduced it in chronic DSS-induced colitis [20]. These data suggest that the beneficial effects of polyphenols on colonic inflammation could be related to dose administered.

During inflammatory processes, neutrophil degranulation releases a large amount of MPO which metabolizes H_2O_2 into HOCl [2]. Moreover, phagocytes (neutrophils and macrophages) infiltrated into the mucosa are activated by proinflammatory factors that will

stimulate ROS production and particularly $O_2^{\bullet-}$ overproduction, thus inducing oxidative stress [37]. Since polyphenols are known for their antioxidant properties [38], we evaluated the antioxidative defenses that could play an important role in macromolecule protection against oxidation. Indeed, ROS are neutralized by endogenous antioxidant enzymes. SOD converts $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 , which is subsequently neutralized to water by CAT or GPx [39]. In our study, SOD and CAT activities were slightly but not significantly decreased by DSS. However, preventive lemon verbena infusion consumption increased SOD activity. A stimulating effect of polyphenols on SOD activity has previously been reported in various models. In the azoxymethane carcinogenesis model, supplementation with the flavonoid luteolin induced an increase of SOD activity [21]. Similarly, in a TNBS model, *Ginkgo biloba* extract stimulated SOD activity, associated with a decrease in colonic lipid peroxidation [40]. Furthermore, it has been shown in colitic interleukin-10 knockout mice that treatment with SOD significantly reduced lipid peroxidation [41]. Such a link can be suggested in our work, since colonic MDA content decreased significantly after lemon verbena infusion consumption. Studies carried out with herbal extracts such as a *Punica granatum* [42] or purified polyphenols such as luteolin [21] have also reported a decrease of colonic lipoperoxidation.

Lemon verbena infusion did not significantly increase other antioxidative enzymes such as CAT or GPx activities in DSS-treated rats. Little is known about the effects of polyphenols on GPx activity during colitis, except that GPx activity is increased by luteolin in azoxymethane-induced colon carcinogenesis [21]. GPx uses reduced glutathione (GSH) as a substrate and produces the oxidized glutathione disulphide GSSG. GSH is an abundant cellular non-enzymatic antioxidant that plays a crucial role in the management of redox modifications and could act as a radical scavenger. In our study with mild-to-moderate colitis, colonic glutathione levels were not modified by DSS or lemon verbena infusion. GSH is often reported to decrease during marked DSS-induced colitis [43, 44] whereas the effects of polyphenols on GSH are less consistent. As an example, green tea polyphenols, which are well-known for their antioxidant properties, were not effective on colonic GSH [44]. Given that GPx activity and GSH amounts were not modified in our experimental conditions, we did not observe any modification of GR activity.

Colitis is usually associated to production of proinflammatory cytokines by immune cells [45]. In our study, DSS did not increase IL-6 level in colon as reported [46]. However, inflammation tended to induce a slight increase of TNF- α level in the colon that was corrected by lemon verbena infusion consumption. Verbascoside has been shown to exert a beneficial effect on TNF- α level in a DNBS model [19].

Little data is available on the impact of DSS on GALT [47]. Proportions of T-lymphocyte subpopulations were modified in Peyer's patches of DSS-treated rats: colitis decreased the percentage of CD4⁺ (T_h) lymphocytes and increased the percentage of CD8⁺ (T_c) cells. A similar trend was observed in inflamed rats exposed to staphylococcal enterotoxin [48]. Lemon verbena infusion consumption tends to counteract the modifications in immune cell subsets observed during colitis.

In conclusion, our study in an experimental model of mild-to-moderate colitis has shown that despite no protective effect on neutrophil infiltration in the colon, preventive consumption of lemon verbena infusion could help manage oxidative stress by stimulating antioxidative enzymes such as SOD and reducing lipid peroxidation. The intestinal absorption and metabolism of lemon verbena polyphenols remain unknown and their evaluation may bring important insight to help understand their *in vivo* properties and contribute to the evaluation of their anti-inflammatory effects.

References

1. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2007;42:16-25.
2. Kruidenier L, Verspaget HW. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:1997-2015.
3. Damiani CR, Benetton CA, Stoffel C, et al. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1846-1851.
4. Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 1995;19:911-918.
5. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulis PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1433-1437.
6. Trebble TM, Arden NK, Wootton SA, et al. Fish oil and antioxidants alter the composition and function of circulating mononuclear cells in Crohn disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1137-1144.
7. Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:348-353.
8. Seidner DL, Lashner BA, Brzezinski A, et al. An oral supplement enriched with fish oil, soluble fiber, and antioxidants for corticosteroid sparing in ulcerative colitis: a randomized, controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3:358-369.
9. Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr*. 2010;104:S15-S27.
10. Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20:1-6.
11. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev*. 2009;67:363-378.
12. Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut*. 2007;56:426-435.
13. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 2005;89:27-36.
14. Teuscher E, Anton R, Lobstein A. *Plantes aromatiques*. Paris: Lavoisier; 2005

15. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1324-1327.
16. Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46:463-470.
17. Zamorano-Ponce E, Morales C, Ramos D, et al. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutat Res.* 2006;603:145-150.
18. Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia.* 1999;70:44-49.
19. Mazzon E, Esposito E, Di Paola R, et al. Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2009;380:79-94.
20. Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, et al. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol.* 2007;148:373-381.
21. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2008;62:590-597.
22. Steghens JP, Flourie F, Arab K, Collombel C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;798:343-349.
23. Steghens JP, van Kappel AL, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:242-249.
24. Perez-Jimenez J, Fezeu L, Touvier M, et al. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:1220-1228.
25. Gaudio E, Taddei G, Vetusch A, et al. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci.* 1999;44:1458-1475.
26. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993;69:238-249.

27. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci.* 1999;61:67-70.
28. Holma R, Salmenpera P, Virtanen I, Vapaatalo H, Korpela R. Prophylactic potential of montelukast against mild colitis induced by dextran sulphate sodium in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58:455-467.
29. Koetzner L, Grover G, Boulet J, Jacoby HI. Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci.* 2010;55:1278-1285.
30. Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:395-406.
31. Arafa HM, Hemeida RA, El-Bahrawy AI, Hamada FM. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:1311-1317.
32. Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Krieglstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2004;49:556-564.
33. Martin AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1399-1410.
34. Cui X, Jin Y, Hofseth AB, et al. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res.* 2010;3:549-559.
35. Karrasch T, Kim JS, Jang BI, Jobin C. The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF-kappaB (EGFP) transgenic mice through blockade of NF-kappaB-dependent protective molecules. *PLoS One.* 2007;2:e596.
36. Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann méd vét.* 2003;147:79-93.
37. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 2008;204:511-524.
38. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med.* 2010;31:435-445.

39. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2003;201:17-27.
40. Zhou YH, Yu JP, Liu YF, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm.* 2006;2006:92642.
41. Segui J, Gil F, Gironella M, et al. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:872-882.
42. Singh K, Jaggi AS, Singh N. Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytother Res.* 2009;23:1565-1574.
43. Camuesco D, Galvez J, Nieto A, et al. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J. Nutr.* 2005;135:687-694.
44. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem.* 2005;16:297-304.
45. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion.* 2000;62:240-248.
46. Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300:G41-51.
47. Vicario M, Amat C, Rivero M, Moreto M, Pelegri C. Dietary glutamine affects mucosal functions in rats with mild DSS-induced colitis. *J Nutr.* 2007;137:1931-1937.
48. Perez-Bosque A, Pelegri C, Vicario M, et al. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. aureus* superantigen B. *J. Nutr.* 2004;134:2667-2672.

Table 1 Food intake, body weight gain and colon length

Groups		Food intake (g)	Body weight gain (%)	Colon length (cm)
2-way ANOVA	C	197 ± 5 ^a	5.48 ± 0.99	17.8 ± 1.0
	V	192 ± 6 ^a	4.91 ± 0.88	17.9 ± 0.6
	DSS	166 ± 13 ^b	2.78 ± 0.59	15.8 ± 0.6
	V-DSS	178 ± 6 ^{a,b}	5.43 ± 0.98	17.3 ± 0.7
	P_{DSS}	0.012	0.226	0.098
	P_V	0.633	0.248	0.255
	$P_{DSS \times V}$	0.324	0.080	0.354

The values are means ± SEM ($n = 6$).

C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group.

^{a,b} Mean values within a column with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

Food intake and body weight gain correspond to the final week of the experiment.

Table 2 Blood cell counts and lymphocyte subpopulations in Peyer's patches

		Blood determinations (10 ⁶ cells/ml blood)			
Groups		Lymphocytes	Monocytes	Polymorphonuclear cells	
2-way ANOVA	C	3.14 ± 0.17	0.42 ± 0.07	0.78 ± 0.17 ^a	
	V	2.51 ± 0.33	0.25 ± 0.03	0.44 ± 0.08 ^a	
	DSS	2.67 ± 0.35	0.34 ± 0.08	1.09 ± 0.23 ^b	
	V-DSS	3.44 ± 0.52	0.30 ± 0.06	0.88 ± 0.17 ^{a,b}	
	<i>P</i> _{DSS}	0.53	0.84	0.04	
	<i>P</i> _V	0.84	0.12	0.12	
	<i>P</i> _{DSS × V}	0.07	0.31	0.68	
		Percentages of lymphocytes subpopulations in Peyer's patches (%)			
		T-cells (CD ³⁺)*	B-cells (CD ^{45RA+})*	Th-cells (CD ³⁺ /CD ⁴⁺) [†]	Tc-cells (CD ³⁺ /CD ⁸⁺) [†]
2-way ANOVA	C	29.5 ± 7.0	43.7 ± 4.0 ^a	92.8 ± 0.3 ^a	4.63 ± 0.27 ^a
	V	28.3 ± 4.7	26.2 ± 6.9 ^b	92.0 ± 0.7 ^{a,c}	4.63 ± 0.65 ^a
	DSS	24.1 ± 3.2	26.8 ± 1.8 ^b	89.5 ± 1.4 ^b	7.15 ± 1.25 ^b
	V-DSS	31.2 ± 0.9	17.5 ± 5.9 ^b	89.6 ± 0.6 ^{b,c}	5.57 ± 0.68 ^{a,b}
	<i>P</i> _{DSS}	0.829	0.025	0.005	0.049
	<i>P</i> _V	0.605	0.031	0.719	0.347
	<i>P</i> _{DSS × V}	0.474	0.464	0.625	0.349

The values are means \pm SEM ($n = 6$).

C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group.

^{a,b,c} Mean values within a column with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

* expressed as percentage of CD^{45+} cells. [†] expressed as percentage of total CD^{3+} cells.

Table 3 Colonic antioxidant enzyme activities

Groups		SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GR (U/mg protein)
2-way ANOVA	C	10.39 ± 1.65 ^{a,b}	92.6 ± 12.7	0.48 ± 0.01	0.078 ± 0.004
	V	14.12 ± 2.08 ^b	98.0 ± 20.6	0.46 ± 0.02	0.078 ± 0.004
	DSS	7.99 ± 1.21 ^a	70.5 ± 10.7	0.47 ± 0.03	0.074 ± 0.004
	V-DSS	14.46 ± 2.90 ^b	81.9 ± 9.8	0.52 ± 0.01	0.080 ± 0.003
	P_{DSS}	0.622	0.192	0.289	0.762
	P_V	0.022	0.558	0.478	0.427
	$P_{DSS \times V}$	0.513	0.836	0.076	0.341

The values are means ± SEM ($n = 6$).

C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group.

^{a,b}Mean values within a column with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). The assays were performed in triplicate.

Table 4 Colonic cytokine levels

Groups		TNF- α (pg/mg protein)	IL-6 (μ g/mg protein)
2-way ANOVA	C	284 \pm 43	1.78 \pm 0.14
	V	232 \pm 26	1.49 \pm 0.19
	DSS	339 \pm 60	1.68 \pm 0.34
	V-DSS	289 \pm 23	1.54 \pm 0.11
	P_{DSS}	0.181	0.917
	P_V	0.224	0.326
	P_{V-DSS}	0.987	0.744

The values are means \pm SEM ($n = 6$).

C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. The assays were performed in duplicate.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Representative HPLC chromatogram of lemon verbena infusion at 320 nm (a). Analysis was carried out with linear gradient conditions from 5% to 25% acetonitrile in 40 min. Representative HPLC chromatogram of hydrolyzed lemon verbena infusion at 350 nm (b). Analysis was carried out with linear gradient conditions from 10% to 30 % acetonitrile in 40 min. Peaks are as follows: a, luteolin-7-diglucuronide; b, glycoside of apigenin; c, glycoside of diosmetin; d, verbascoside; e, isoverbascoside; f, luteolin; g, apigenin; h, diosmetin. The assays were performed in triplicate.

Fig. 2 Histological colonic mucosal analysis: section of control (a) or verbena infusion (b) colons showed normal mucosa with intact epithelial surface whereas DSS-induced colitis rats (c) presented massive epithelium and glandular destruction (1), cryptic dilatation (2), polymorphonuclear infiltration (3), oedema (4) or submucosa extension of inflammation (5). Lemon verbena infusion consumption did not attenuate the severity of damage (d) (hematoxylin-eosin-safran staining; original magnification x 20).

Fig. 3 Histological score. Values are means \pm SEM ($n = 6$). ^{a,b}Mean values with different superscript letters were significantly different. Two-way non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA ($P_{DSS} < 0.001$) followed by a Mann-Whitney test ($P < 0.01$). C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group.

Fig. 4 Colonic myeloperoxidase (MPO) activity. Values are means \pm SEM ($n = 6$). ^{a,b}Mean values with different superscript letters were significantly different. Two-way ANOVA ($P_{DSS} < 0.01$) followed by an LSD Fisher test ($P < 0.05$). C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. The assay was performed in triplicate.

Fig. 5 Colonic total glutathione and reduced glutathione (GSH) content ($\mu\text{mol/g}$ proteins). Values are means \pm SEM ($n = 6$). C, control group; V, verbena infusion group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. The assays were performed in duplicate.

Fig. 6 Colonic total malondialdehyde (MDA) content. Values are means \pm SEM ($n = 6$). ^{a,b}Mean values with different superscript letters were significantly different. Two-way ANOVA ($P_V < 0.001$) followed by an LSD Fisher test. C, control group; V, verbena infusion

group; DSS, DSS group; V-DSS, verbena infusion-plus-DSS group. The assay was performed in duplicate.

Fig. 1

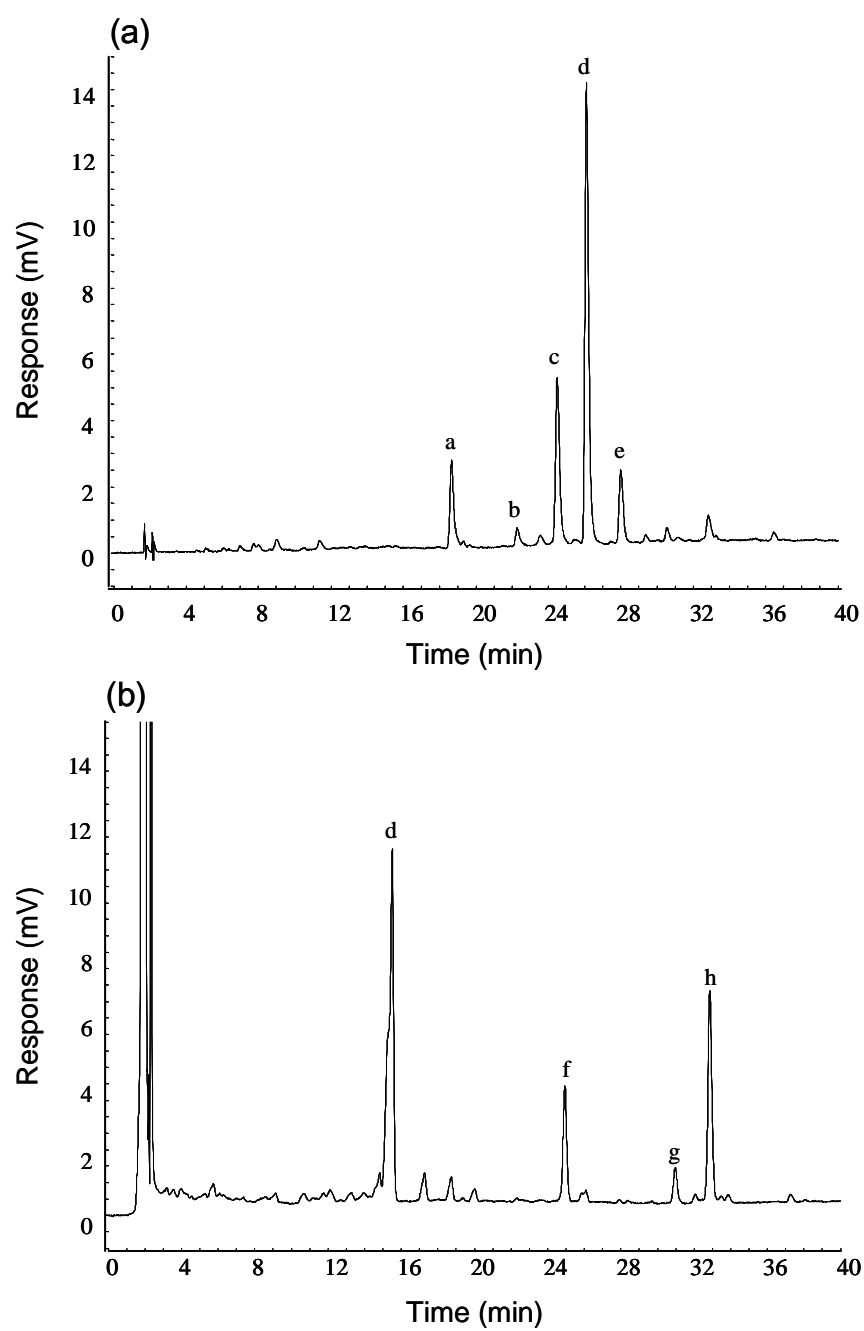


Fig. 2

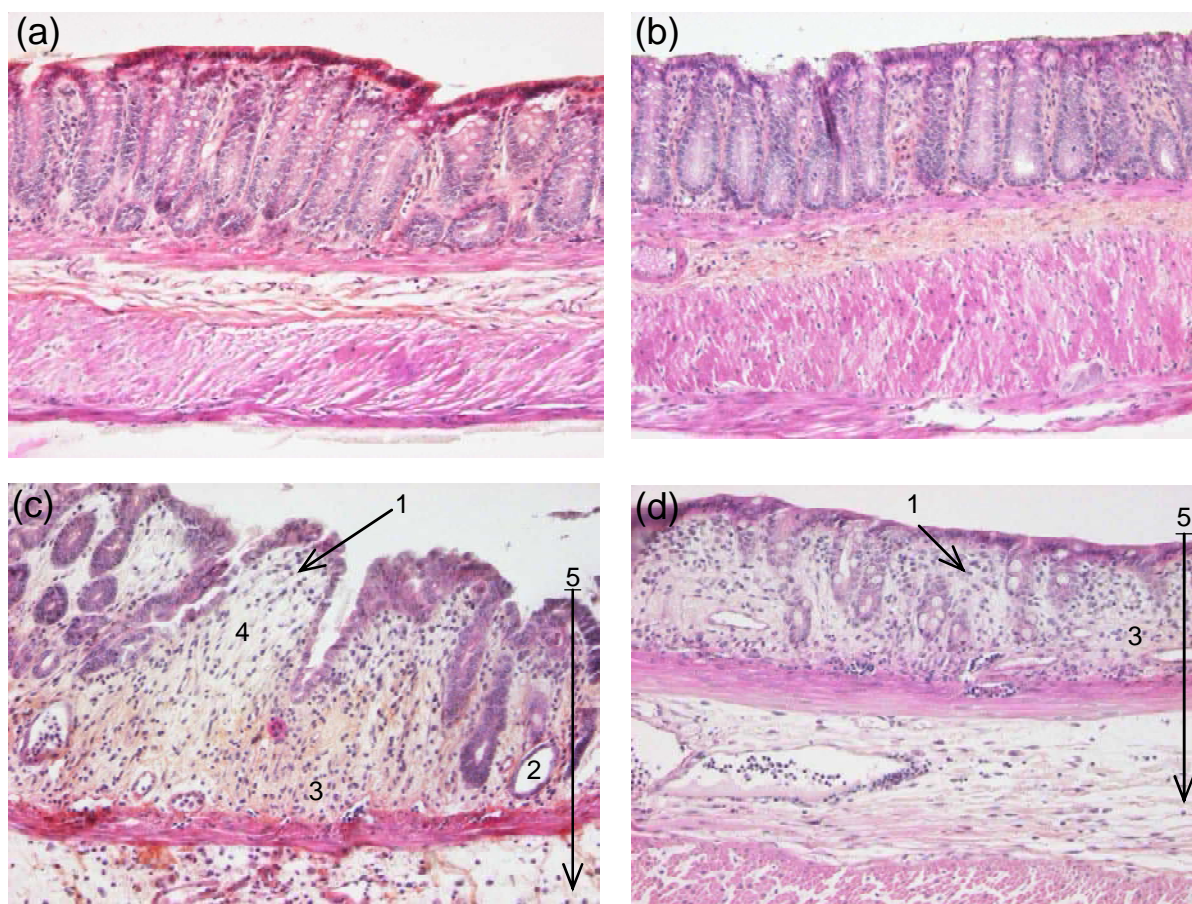


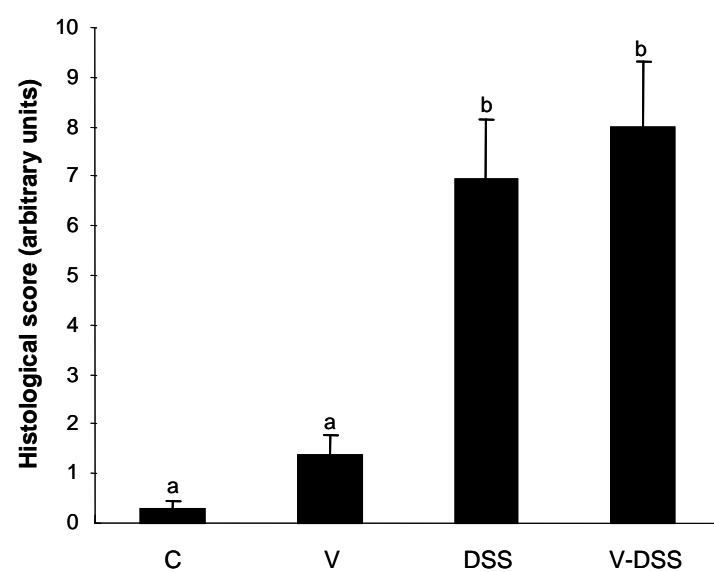
Fig. 3

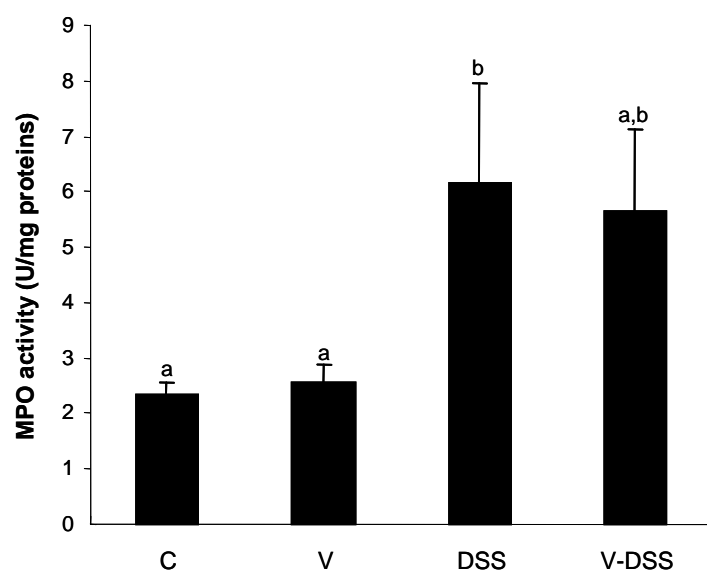
Fig. 4

Fig. 5

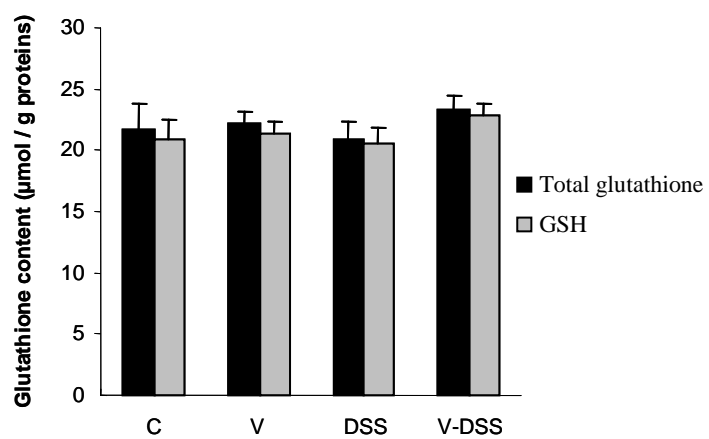
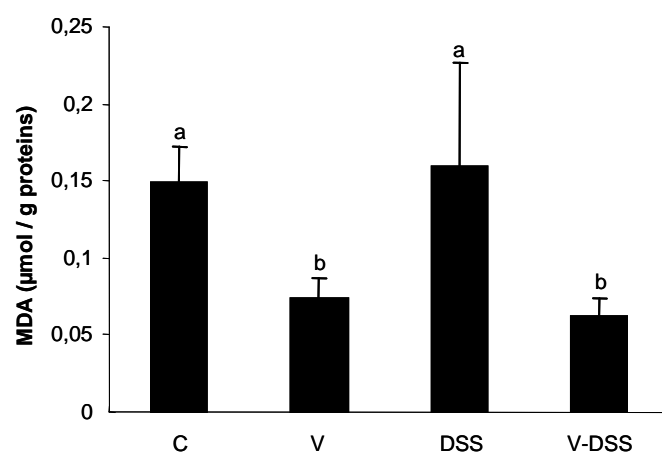


Fig. 6

Etude n°3

***Consommation préventive d'infusé de verveine odorante
sur l'inflammation colique chez le rat,
influence de la dose***

OBJECTIF :

Les deux études précédentes avaient pour objectif d'évaluer l'effet d'une consommation préventive d'infusé de verveine odorante aux concentrations de 40 g/l et de 4 g/l dans un modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS chez le rat. Cependant, les conditions expérimentales utilisées (DSS à 4% pendant 7 jours) ne nous ont pas permis d'obtenir une atteinte colique nette, en particulier au niveau clinique et lors de la mesure des paramètres du stress oxydant. De plus, nous avons observé une variation du score histologique chez les rats enflammés (DSS) entre les deux expériences précédentes, ce qui n'a pas permis de comparer directement les résultats de ces deux études. Ainsi, l'étude n°3 a été réalisée afin d'évaluer au cours d'une même phase expérimentale l'effet de la concentration de l'infusé de verveine odorante (40 g/l et à 4 g/l). Afin d'obtenir une inflammation plus marquée, la période d'administration du DSS à 4% a été allongée de 2 jours (soit un total de 9 jours). L'effet de la consommation préventive de l'infusé de verveine odorante sur les marqueurs de l'inflammation, les profils cytokiniques et les défenses antioxydantes a été évalué.

SCHEMA EXPERIMENTAL :

Des rats mâles Wistar (175-180 g) (n=36) placés en cages individuelles dans une pièce à température contrôlée (22°C) avec une période d'obscurité de 7h00 à 19h00 ont été acclimatés pendant une semaine au sein de l'unité d'expérimentation animale de l'Université d'Auvergne. Les rats ont ensuite été répartis en 3 groupes recevant comme boisson *ad libitum* soit de l'eau, soit de l'infusé de verveine odorante à 4 g/l, soit de l'infusé de verveine odorante à 40 g/l. Le 14^{ème} jour, chaque groupe a été scindé en 2 et la moitié des animaux de chaque groupe a reçu durant 9 jours du DSS à 4% dans sa boisson. On a ainsi constitué 6 groupes d'animaux (n = 6 par groupe) (**Figure 49**) : un groupe contrôle (C), un groupe enflammé (DSS), un groupe recevant l'infusé de verveine à 4 g/l (V4), un groupe recevant l'infusé de verveine à 4 g/l plus le DSS (V4-DSS), un groupe recevant l'infusé de verveine à 40 g/l (V40) et un groupe recevant l'infusé de verveine à 40 g/l plus le DSS (V40-DSS). Le 23^{ème} jour, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Le côlon a été prélevé de la jonction avec le cæcum jusqu'au rectum et sa longueur mesurée. Un fragment distal (1 cm) a été prélevé en vue de l'analyse histologique. Le reste du côlon est coupé longitudinalement en 4 segments, pesés, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

RESULTATS :

I. Concentration en polyphénols dans les infusés de verveine et consommation des infusés

Les concentrations en polyphénols des deux infusés de verveine odorante ont été déterminées par HPLC et sont rassemblées dans le **Tableau 19**.

Au cours des 9 derniers jours d'expérimentation, la consommation d'infusé a été suivie quotidiennement. Celle-ci est significativement plus élevée dans le groupe V40-DSS *vs* les autres groupes ($p < 0,01$) (**Tableau 20**). Cette augmentation de la consommation d'infusé se répercute sur la quantité de polyphénols ingérés (**Tableau 20**) qui est significativement plus forte dans le groupe V40-DSS ($p < 0,01$).

II. Consommation alimentaire et prise de poids (Tableau 21)

Au cours des 9 derniers jours de l'expérimentation, les rats des groupes DSS et V4-DSS mangent moins que leurs contrôles respectifs (groupes C et V4, $p < 0,05$). La prise alimentaire n'est pas significativement diminuée chez les animaux du groupe V40-DSS comparativement au groupe V40. Le gain de poids est significativement diminué par le DSS (de l'ordre de 47% dans le groupe DSS *vs* C, de 35% dans le groupe V4-DSS *vs* V4 et de 40% dans le groupe V40-DSS *vs* V40). Des saignements rectaux sont observés chez un rat du groupe DSS au 8^{ème} jour et chez trois rats du groupe V40-DSS : deux au 7^{ème} jour et un au 8^{ème} jour. Aucun saignement rectal n'a été observé chez les rats des autres groupes.

III. Poids des organes et longueur du côlon (Tableau 22)

Aucune modification significative des poids du thymus et du foie n'est observée. Le poids de la rate est augmenté chez les rats du groupe V40-DSS *vs* V40 ($p < 0,05$). L'inflammation induit un raccourcissement du côlon (DSS *vs* C, $p < 0,01$). Cet effet se retrouve chez les rats du groupe V4-DSS *vs* V4 ($p < 0,01$). Par contre, la consommation de l'infusé de verveine-40 permet de prévenir la rétraction du côlon induite par le DSS (V40-DSS *vs* DSS, $p < 0,05$).

IV. Analyse histologique

Les côlons des rats ayant reçu du DSS (DSS, V4-DSS et V40-DSS) présentent focalement une destruction de l'épithélium, une infiltration de la muqueuse par les PNN, une dilatation des cryptes, un mucus épais ainsi qu'un chorion œdémateux dans la muqueuse et la sous-muqueuse (**Figure 50**). Le score histologique (**Figure 51**) est significativement augmenté chez les rats enflammés (groupes DSS, V4-DSS et V40-DSS) comparativement aux groupes contrôles ($p < 0,05$). La consommation d'infusé de verveine odorante ne limite pas les atteintes histopathologiques, quelle que soit la dose.

V. Activité MPO colique

L'activité MPO, marqueur de l'inflammation, est significativement augmentée dans le groupe DSS comparativement à l'ensemble des autres groupes ($p < 0,05$) (**Figure 52**). La consommation de verveine-4 ou de verveine-40 permet donc de corriger cette augmentation d'activité MPO.

VI. Enzymes antioxydantes et glutathion au niveau du côlon

Le **Tableau 23** présente les activités des enzymes antioxydantes analysées. L'administration du DSS ne modifie pas l'activité SOD, cependant la consommation de l'infusé verveine-4 induit une diminution de l'activité de cette enzyme que les rats soient enflammés ou non (V4 vs C, $p < 0,05$ et V4-DSS vs DSS, $p < 0,01$). La verveine-40 n'agit pas sur l'activité SOD. L'activité de la GR est significativement diminuée dans les groupes DSS, V4 et V40 (vs C, $p < 0,05$). La consommation de l'infusé de verveine, quelle que soit sa concentration, chez les rats enflammés corrige la diminution d'activité induite par le DSS (V4-DSS vs DSS et V40-DSS vs DSS, $p < 0,05$). Les activités CAT et GPx ne sont pas modifiées significativement dans ces conditions expérimentales. De même, aucune variation significative n'est observée pour les taux de glutathion colique (**Figure 53**).

VII. Dosage des cytokines dans le côlon

L'ensemble des données concernant le dosage des cytokines dans la muqueuse colique est rassemblé dans le **Tableau 24**. L'administration de DSS seul n'affecte pas significativement les taux de cytokines dans la muqueuse colique. Cependant, chez les rats

enflammés, la consommation de verveine-40 diminue les taux d'IL-6 (V40-DSS *vs* V-40, $p < 0,01$) et de TNF- α (V40-DSS *vs* DSS, $p < 0,05$).

CONCLUSION :

Ces résultats montrent d'une part que l'augmentation de la durée d'administration du DSS ne permet pas d'accentuer la sévérité de l'inflammation colique. D'autre part, les effets protecteurs de la consommation préventive d'infusé de verveine sont moins nombreux lors d'une inflammation induite sur 9 jours que ce qui a été précédemment observé sur 7 jours. Dans de telles conditions expérimentales, l'infusé le plus concentré semble offrir plus d'effets protecteurs.

DISCUSSION

Discussion

Les tisanes constituent une forme de consommation traditionnelle des plantes médicinales et font partie des boissons non alcoolisées les plus populaires. Cette popularité est en partie due à leur parfum, leur saveur et leurs propriétés médicinales et plus particulièrement celles concernant les systèmes respiratoires et digestifs. L'infusion des plantes médicinales permet une bonne extraction des principes actifs hydrosolubles et en particulier des polyphénols. Parmi les infusés consommés en grande quantité, l'infusé de verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) est riche en acides phénoliques complexes (verbascoside et isoverbascoside) et en dérivés de flavones (lutéoline 7-digucuronide, glycosides de diosmétine et d'apigénine).

Les polyphénols sont connus pour participer à l'effet protecteur d'une alimentation riche en fruits et légumes face à certaines pathologies (maladies cardiovasculaires, diabète, ostéoporose, cancers...). Cet effet des polyphénols serait en partie dû à leurs propriétés antioxydantes. Par ailleurs, de nombreuses études ont souligné l'intérêt d'une approche nutritionnelle dans la prise en charge de l'inflammation intestinale et les polyphénols pourraient jouer un rôle intéressant dans ce contexte. En effet, il est connu qu'une grande partie des polyphénols consommés n'est pas absorbée au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et arrive ainsi au niveau du côlon. Plusieurs études menées sur des modèles animaux d'inflammation intestinale ont montré que les polyphénols pouvaient agir sur l'inflammation colique. Les polyphénols auraient une action sur les populations lymphocytaires impliquées dans la réponse immunitaire ainsi que sur les médiateurs de l'inflammation associés comme les cytokines. Il a également été décrit que ces micronutriments étaient capables de protéger les structures cellulaires des altérations oxydatives et stimulaient l'expression et l'activité des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques face au stress oxydant associé à l'inflammation intestinale.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer l'effet d'une consommation régulière d'un infusé de verveine odorante, riche en polyphénols, dans un modèle expérimental d'inflammation intestinale chez le rat. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au métabolisme des polyphénols de l'infusé de verveine odorante et à leur excrétion urinaire en conditions physiologique ou inflammatoire. D'autre part, ces travaux ont permis d'évaluer l'effet de cet infusé sur les signes cliniques et les marqueurs de l'inflammation colique. Nous avons également exploré l'effet de la consommation de

verveine odorante sur les populations de cellules immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire au niveau des structures lymphoïdes secondaires associées à la muqueuse intestinale ainsi qu'au niveau sanguin. Enfin, l'impact sur le stress oxydant associé au phénomène inflammatoire a également été étudié. Ces études ont été menées avec des infusés préparés par infusion de 40 g/l de feuilles de verveine odorante puis dilution ou non au dixième (infusés « forte dose » et « faible dose »), ce qui correspond à des concentrations nutritionnelles en polyphénols. Ces infusés ont été administrés comme boisson à des rats en association ou non avec un agent connu pour induire une inflammation colique, le sulfate de dextran sodique (DSS).

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de montrer d'une part que la consommation d'un infusé de verveine odorante riche en polyphénols pouvait moduler les atteintes histologiques, les populations immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire ainsi que le stress oxydant associé. D'autre part, la concentration de l'infusé administré ainsi que les conditions expérimentales choisies peuvent influencer les effets observés.

Polyphénols de l'infusé de verveine odorante

Polyphénols consommés au cours des différentes études

Les infusés de verveine odorante ont été préparés lors de chaque étude selon le protocole décrit dans la partie **Matériel et méthodes** et les polyphénols ont été quantifiés par HPLC. L'infusé renferme des acides phénoliques complexes (verbascoside et isoverbascoside) et des flavones (Bilia *et al.* 2008). Parmi celles-ci, la lutéoline 7-diglucuronide avait été préalablement identifiée au laboratoire (Carnat *et al.* 1999). La feuille de verveine odorante que nous avons utilisée renferme également une forte proportion d'un glycoside de diosmétine et une faible quantité d'un glycoside d'apigénine. A ce jour, la nature de la partie glycosidique de ces dérivés n'est pas connue avec certitude. Afin d'évaluer approximativement la masse de polyphénols consommés par les rats, nous avons considéré que les dérivés d'apigénine et de diosmétine étaient sous forme de glucosides. Ainsi, les rats recevant de l'infusé à 40 g/l auraient consommé de l'ordre de 44 mg/j de polyphénols et ceux recevant l'infusé de verveine dilué de l'ordre de 2,7 mg/j (**Tableau 25**). Ces quantités correspondent respectivement à des apports équivalents chez l'homme d'environ 880 mg et 54 mg de polyphénols par jour. Ce

calcul est basé sur les teneurs en polyphénols rapportées à la matière sèche consommée et estimée à 500 g/j chez l'homme. Cette extrapolation confirme que nos études sont réalisées dans des conditions nutritionnelles puisque les quantités de polyphénols ingérées restent inférieures à la quantité moyenne de polyphénols consommés par jour couramment admise chez l'Homme (environ 1 g) (Perez-Jimenez *et al.* 2011).

Excrétion urinaire des polyphénols de l'infusé de verveine odorante (Etude 1)

De nombreux travaux ont souligné le rôle protecteur des polyphénols dans différents contextes pathologiques (Scalbert *et al.* 2005). Cependant, afin de comprendre les effets bénéfiques de ces composés, il est nécessaire de connaître leur devenir dans l'organisme. L'étude de l'excrétion urinaire des polyphénols de la verveine odorante nous a permis une première approche de l'absorption et du métabolisme de ces composés. La plupart des flavonoïdes ingérés ne sont pas retrouvés intacts dans l'organisme mais sous forme de dérivés conjugués après avoir été déglycosylés au cours de leur absorption par les entérocytes de l'intestin grêle (Hollman *et al.* 1995; Day *et al.* 1998; Day *et al.* 2000) puis soumis à diverses réactions de conjugaison (glucuronidation, sulfatation, méthylation) dans les entérocytes et le foie (Scalbert *et al.* 2000). Ainsi, aucune flavone libre n'a été détectée dans les urines des rats consommant l'infusé de verveine. Les conjugués de flavones présents dans les urines ont été quantifiés sous forme de génines après hydrolyse par la β -glucuronidase/sulfatase. Nous avons ainsi mis en évidence au niveau urinaire quatre flavones : lutéoline, apigénine, diosmétine et chrysoériol. Le chrysoériol est un dérivé méthylé qui pourrait résulter de la méthylation en 3' de la lutéoline. Il a en effet été récemment montré que l'enzyme de phase II catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT) catalysait la méthylation de la lutéoline sur ses fonctions hydroxyles en 3' ou en 4' lors de son absorption, conduisant respectivement à la présence de chrysoériol et de diosmétine dans les urines et le plasma chez le rat (Chen *et al.* 2011). La diosmétine peut provenir du glycoside de diosmétine présent dans l'infusé mais peut également être issue de la méthylation de la lutéoline (Shimoi *et al.* 1998). L'excrétion urinaire de la lutéoline rapportée à la quantité de lutéoline 7-diglucuronide ingérée (0,34% avant DSS et 0,18% après DSS) est plus faible que ce qui a été rapporté pour la lutéoline 7-glucoside (6,6%) (Chen *et al.* 2007). La nature de la glycosylation pourrait ainsi influencer l'absorption et l'excrétion de ces composés. Seule une faible proportion d'acides phénoliques complexes intacts (verbascoside et isoverbascoside) est retrouvée dans l'urine. Peu de données concernant le métabolisme du verbascoside sont actuellement disponibles. Il a cependant été

montré que son absorption était rapide (pic plasmatique 20 à 30 min après administration orale) et que sa biodisponibilité était faible (Wu *et al.* 2006; Funes *et al.* 2009).

Les acides caféique et férulique détectés dans les urines peuvent avoir diverses origines. Ils pourraient être issus du métabolisme des flavonoïdes par la microflore colique (Scheline *et al.* 1991). L'acide caféique pourrait également provenir du verbascoside et l'acide férulique pourrait résulter de la méthylation de l'acide caféique (Rechner *et al.* 2001; Moridani *et al.* 2002). La présence d'impuretés dans les urines n'a pas permis une quantification exacte de l'acide caféique. Par ailleurs, nous avons détecté une quantité importante d'acide férulique chez les rats ne consommant pas la verveine ($\approx 5,4 \mu\text{mol}/24\text{h}$), acide férulique qui pourrait provenir de l'alimentation des rats. La quantité d'acide férulique excrétée dans les urines de rats consommant la verveine est cependant supérieure à celle mesurée chez les rats contrôles, confirmant la formation de cet acide phénolique au cours du métabolisme des polyphénols de l'infusé de verveine.

Les faibles pourcentages d'excrétion urinaire des polyphénols détectés dans notre étude semblent indiquer que la majeure partie des polyphénols n'est pas directement absorbée au niveau de l'intestin grêle. Ceci pourrait être en partie lié à leur structure (complexité du verbascoside et de l'isoverbascoside, groupement diglucuronide sur la lutéoline). Ces micronutriments non absorbés pourraient ainsi arriver jusqu'au côlon où ils pourraient être dégradés par la microflore colique puis absorbés (Scalbert *et al.* 2002). Ces polyphénols et leurs produits de dégradation pourraient également exercer une action bénéfique au niveau colique. Il a été montré que les concentrations de polyphénols dans le côlon pouvaient atteindre plusieurs centaines de μM et que ces micronutriments, avec quelques caroténoïdes, constituaient les seuls antioxydants alimentaires présents dans le côlon (Scalbert *et al.* 2000). Le DSS induit une inflammation intestinale localisée essentiellement dans la partie distale du côlon (Gaudio *et al.* 1999). L'absorption des polyphénols au niveau de l'intestin grêle ne serait ainsi pas modifiée. Par contre, le métabolisme des polyphénols et leur absorption au niveau du côlon pourraient être affectés par l'inflammation. L'utilisation d'un régime semi-synthétique dépourvu de polyphénols pourrait permettre d'évaluer plus précisément l'excrétion urinaire des acides phénoliques résultant du métabolisme des polyphénols de la verveine odorante par la microflore colique.

Effet de la consommation de l'infusé de verveine odorante sur les signes cliniques et les marqueurs de l'inflammation

Les signes cliniques

Comme décrit précédemment, le modèle d'inflammation intestinale induite par l'administration de DSS dans la boisson chez le rongeur est un des modèles les plus couramment utilisés. L'apparition de différents signes cliniques permet de suivre le développement de l'inflammation. La colite se caractérise par une modification de la consistance des selles pouvant aller jusqu'à la diarrhée ainsi que par l'apparition de saignements rectaux. Au cours de l'étude 1, les premières selles molles sont apparues le troisième jour. Des saignements accompagnés de diarrhée ont été observés après 5 jours d'administration de DSS seul chez 33% des animaux. La consommation de verveine réduit la proportion de rats présentant ces signes (17%) et retarde leur apparition (7^{ème} jour). Lors de l'étude 2, les diarrhées accompagnées de saignements ont été observées lors des 6^{ème} et 7^{ème} jours d'inflammation chez 33% des rats DSS et 17% des rats V-DSS. Ainsi l'infusé faiblement dosé permet de limiter ces signes cliniques dans les mêmes proportions que la verveine à forte dose. Cependant, dans l'étude 3 (9 jours, 6 rats par groupe), la présence de sang dans les selles a été observée tardivement et uniquement dans les groupes DSS (1 rat au 8^{ème} jour) et V40-DSS (1 rat au 7^{ème} et 1 au 8^{ème} jour).

L'inflammation colique se caractérise, également par une diminution de la consommation alimentaire des animaux associée à une diminution de la prise de poids, voire à une perte de poids (Kullmann *et al.* 2001). Bien que l'infusé de verveine odorante affecte peu la prise alimentaire des animaux DSS, lors d'une inflammation induite sur 7 jours (Etudes 1 et 2) nous avons observé une correction du gain de poids corporel indépendamment de l'infusé consommé. Par contre, lorsque l'inflammation est induite pendant 9 jours (Etude 3), la verveine ne permet pas de rétablir la prise pondérale. Des effets protecteurs des polyphénols sur ces paramètres ont déjà été mis en évidence. C'est le cas pour le polyphénol majoritaire de l'infusé de verveine, le verbascoside (Hausmann *et al.* 2007; Mazzon *et al.* 2009) ou pour la lutéoline qui offre une protection lorsqu'elle est administrée sous forme de génine (Ashokkumar *et al.* 2008). Cependant, d'autres effets ont été décrits pour certains polyphénols comme ceux du thé vert qui, administrés à 0,5% ou 1% dans le régime, ne limitent pas la perte de poids induite dans le modèle DSS (Kim *et al.* 2010).

Les marqueurs de l'inflammation

L'inflammation colique se caractérise par une rétraction du côlon (Jurjus *et al.* 2004; Solomon *et al.* 2010). Nous avons observé cette réduction de la longueur du côlon au cours des trois études. Lorsque le DSS est administré pendant 7 jours à 4%, il induit une rétraction du côlon de 11,7% (Etude 1) et de 11,2% (Etude 2). Dans les deux cas, la consommation de l'infusé à forte et faible concentration a permis de limiter cette rétraction du côlon. Lorsque le DSS est administré pendant 9 jours (Etude 3), la rétraction est plus marquée (17,8%) et seul l'infusé à 40 g/l permet de limiter cet effet. Ainsi l'infusé de verveine odorante pourrait avoir un effet protecteur sur la longueur du côlon limité dans le temps selon sa concentration. Un effet protecteur sur la rétraction du côlon a été montré pour différents polyphénols comme par exemple le verbascoside (Hausmann *et al.* 2007) ou le resvératrol (Larrosa *et al.* 2009). Certains polyphénols peuvent avoir des effets variables selon les conditions expérimentales : chez la souris, les polyphénols du thé vert n'ont pas d'effet protecteur, voire un effet aggravant, lors d'une inflammation induite par le DSS à 2% pendant 6 jours (Kim *et al.* 2010) tandis qu'ils permettent de prévenir cette réduction du côlon lorsque le DSS est administré à 4% pendant 7 jours (Oz *et al.* 2005).

L'analyse en microscopie optique nous a permis d'évaluer les atteintes histologiques au niveau du côlon. Au cours de l'étude 1, l'atteinte histologique induite par le DSS est bien marquée (score histologique : 12,4). Dans ces conditions, la consommation de l'infusé de verveine a permis de protéger partiellement la muqueuse colique (score histologique : 8,72). Des effets préventifs de polyphénols purifiés (verbascoside (Mazzon *et al.* 2009), curcumine (Arafa *et al.* 2009), resvératrol (Martin *et al.* 2004)) ou d'extraits végétaux riches en polyphénols (extrait de *Mangifera indica* (Marquez *et al.* 2010), infusion de *Turnera ulmifolia* (Galvez *et al.* 2006)) ont également été observés au cours de l'inflammation colique. Au cours des études 2 et 3, le score histologique induit par le DSS était plus faible (Etude 2 : 6,94 et Etude 3 : 5,78). De plus, lors de l'étude 3 les altérations induites par le DSS étaient nettement plus focales que lors des études précédentes. Dans ces conditions, les différentes infusions de verveine odorante n'ont pas permis de corriger les altérations de la muqueuse colique. Une absence de protection sur les atteintes histologiques a été mise en évidence pour les polyphénols du thé vert administrés à différentes doses (0,1%, 0,25%, 0,5% et 1% de polyphénols dans l'alimentation), ceci associé à une rétraction plus marquée du côlon (Kim *et al.* 2010).

La colonisation du tissu colique par les PNN est un des paramètres évalués au cours de l'analyse histologique. Ces cellules de l'immunité innée colonisent rapidement la muqueuse colique lors d'une inflammation et renferment dans leurs granules azurophiles primaires la MPO. L'activité de cette enzyme est ainsi directement liée à la colonisation du côlon par les PNN et est couramment utilisée comme marqueur de l'inflammation (Sertejn *et al.* 2003). Quelle que soit l'étude considérée, nous avons observé une augmentation significative de l'activité MPO par le DSS. Les effets obtenus après consommation préventive des infusés de verveine odorante sont hétérogènes. Au cours des études 1 et 2 menées sur 7 jours, la verveine ne réduit pas l'activité de cette enzyme. Par contre lorsque le DSS est administré pendant 9 jours (Etude 3), la consommation des infusés à faible et forte dose prévient la forte augmentation de l'activité MPO induite par le DSS. Il semblerait ainsi que les effets sur la MPO et le score histologique ne soient pas directement reliés. En effet, la colonisation du tissu par les neutrophiles n'est qu'un paramètre parmi 9 dans la construction du score histologique. De plus, il a été récemment montré que l'extrait de *Ginkgo biloba* induisait une diminution de l'activité MPO sans avoir d'effet sur le score histologique (dos Reis *et al.* 2009) et inversement pour l'infusion de *Turnera ulmifolia* (Galvez *et al.* 2006).

Effet de la consommation d'infusé de verveine odorante sur les cellules immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire

L'effet des polyphénols sur les cellules immunitaires et leurs mouvements au cours de l'inflammation intestinale a été très peu étudié. D'autre part, malgré sa fréquente utilisation, le modèle expérimental DSS n'est pas complètement caractérisé en ce qui concerne les réponses immunitaires impliquées dans la réaction inflammatoire tant au niveau local que systémique (Hall *et al.* 2011).

Récemment, Hall *et al.* (2011) ont étudié la répartition des différentes cellules immunitaires dans les structures lymphoïdes (ganglions mésentériques, thymus) et dans le côlon lors de l'inflammation intestinale induite par le DSS. Cette étude cinétique montre que les cellules dendritiques, les macrophages et les PNN, cellules de l'immunité innée, augmentent dès le premier jour d'administration et sont les premières à réagir à l'agression de la muqueuse par le DSS (Hall *et al.* 2011). Par ailleurs, les PNN sont colocalisés avec les lymphocytes T dans la muqueuse dès le début de l'induction de l'inflammation suggérant ainsi leur rôle dans l'activation de ces lymphocytes, cellules de l'immunité adaptative (Hall *et*

al. 2011). De plus, les cellules dendritiques également présentatrices d'antigène sont colocalisées avec les lymphocytes B. Une fois activées, les cellules B gagnent les ganglions mésentériques où ont lieu les étapes de maturation et d'expansion clonale en partie sous l'influence du TGF- β sécrété par les cellules dendritiques (Kunisawa *et al.* 2005).

Au cours de nos deux premières études, nous nous sommes intéressés aux populations cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire. L'inflammation intestinale a été induite par du DSS à 4% pendant 7 jours et nous avons mesuré l'effet de la consommation de l'infusé de verveine odorante à forte (Etude 1) et faible (Etude 2) dose sur les cellules immunitaires circulantes ainsi que sur celles extraites des structures lymphoïdes secondaires (ganglions mésentériques et plaques de Peyer).

Dans l'étude 1, nous avons observé sous l'influence du DSS une diminution du pourcentage des lymphocytes B dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, suggérant une mobilisation de ces cellules. Par ailleurs, le pourcentage de lymphocytes T n'étant pas modifié dans ces structures, cela induit une élévation du ratio T/B comme précédemment observé dans les plaques de Peyer chez le jeune rat soumis à du DSS à 0,5% (Vicario *et al.* 2007). La diminution de la proportion de lymphocytes B dans les structures lymphoïdes laisse supposer un retour de ces cellules vers le côlon comme cela a été rapporté (Takedatsu *et al.* 2008; Hall *et al.* 2011). Cette migration des cellules est soutenue par la sécrétion des cytokines IL-5 et IL-6 favorisant également la sécrétion d'IgA par les lymphocytes B (Kunisawa *et al.* 2005). D'autre part, la consommation de verveine (40 g/l) ne rétablit pas la proportion de lymphocytes B dans les structures lymphoïdes secondaires mais induit une forte augmentation du nombre de lymphocytes B dans le sang qui pourrait indiquer une migration de ceux-ci vers le site inflammatoire. Lors de l'inflammation, les cellules B sont impliquées dans la production d'anticorps spécifiques à l'antigène et d'immunoglobulines activant le complément ou les mastocytes (Roitt *et al.* 2002). Cependant, différentes études ont montré que ces cellules pouvaient également jouer un rôle régulateur sur les cellules T effectrices et favoriser ainsi l'arrêt d'une réaction inflammatoire (Fillatreau *et al.* 2008). Les lymphocytes B présents au niveau de la muqueuse intestinale sont spécialisés dans la sécrétion d'IgA qui constituent la première ligne de défense des muqueuses digestives (neutralisation de virus et de bactéries, protection de la muqueuse contre la pénétration par les microorganismes pathogènes) (Kunisawa *et al.* 2005; Woof *et al.* 2005). Des études menées chez des patients atteints de RCH ont montré que l'augmentation des atteintes tissulaires était associée à une diminution de la sécrétion d'IgA dans le côlon (Brandtzaeg *et al.* 2006). Ceci a

été confirmé dans le modèle DSS chez la souris où une diminution du taux d'IgA fécal est observée chez les animaux enflammés (Lim *et al.* 2003). Par ailleurs, des études *in vitro* ou *in vivo* ont montré que des polyphénols (polyphénols du vin rouge, wogonine, curcumine) pouvaient, dans diverses situations, augmenter la sécrétion d'IgA (Lim 2004; Magrone *et al.* 2008; Okazaki *et al.* 2010). Les cellules B peuvent également limiter la réaction immunitaire par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et TGF- β (Fillatreau *et al.* 2008). Certains auteurs ont décrit un effet stimulateur de polyphénols comme le resvératrol (Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010) ou la curcumine (Camacho-Barquero *et al.* 2007) sur le taux d'IL-10 colique.

L'étude de Hall *et al.* (2011) chez la souris recevant du DSS à 3% pendant 6 jours a également montré une diminution du pourcentage de lymphocytes T dans les ganglions mésentériques dès les premiers jours d'administration du DSS et tout au long de la phase expérimentale (Hall *et al.* 2011). Dans l'étude 1, nous n'observons pas de diminution du pourcentage de lymphocytes T dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques après administration de DSS seul ou associé à l'infusé de verveine odorante. Cependant, nous observons une modification des pourcentages des sous-populations de lymphocytes T dans les ganglions mésentériques. Ainsi, le DSS induit une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ helper associée à une diminution des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Ces modifications sont corrigées par la consommation de l'infusé qui limite également la proportion de lymphocytes T CD4⁺ dans les ganglions mésentériques au cours de l'inflammation colique. Il est cependant difficile de conclure sur ce point dans la mesure où cette tendance n'est pas retrouvée au niveau circulant. Des mouvements de cellules similaires induits par le DSS à 3% ont été observés dans les ganglions mésentériques chez la souris (Lim *et al.* 2003; Singh *et al.* 2010) et associés à une augmentation de cellules CD4⁺ dans la *lamina propria* (Singh *et al.* 2010). Cette dernière étude a également montré que l'administration orale de resvératrol (100 mg/kg) corrigeait l'augmentation de cellules CD4⁺ (Singh *et al.* 2010). De même, la wogonine (20 mg/kg) administrée préventivement pendant 2 semaines chez la souris corrige l'augmentation de cellules CD4⁺ et la diminution de cellules CD8⁺ induites par le DSS dans les ganglions mésentériques (Lim 2004). Les cellules CD4⁺ jouent un rôle majeur dans le développement des atteintes intestinales et la réaction inflammatoire locale (Shintani *et al.* 1998). L'augmentation des lymphocytes T CD8⁺ dans les ganglions mésentériques par l'infusé de verveine odorante est également observée dans le sang, ce qui laisse envisager, comme pour les lymphocytes B, une migration de ces cellules vers le site de l'inflammation.

Or, il semblerait que les cellules CD8⁺ puissent jouer un rôle dans la régulation de l'inflammation et l'absence de telles cellules a été décrite dans la *lamina propria* de patients atteints de MICI (Brimnes *et al.* 2005).

Dans l'étude 2, nous avons testé l'effet d'un infusé de verveine odorante à faible dose (4 g/l) dans les mêmes conditions que précédemment et étudié également les populations cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire. Les résultats obtenus diffèrent en plusieurs points de ce qui a pu être observé précédemment. L'analyse des populations cellulaires circulantes montre une augmentation des PNN après administration du DSS et une atténuation lors de la consommation d'infusé de verveine faiblement dosé. Cette mobilisation des neutrophiles peut être mise en relation avec le phénomène inflammatoire se caractérisant par une colonisation rapide de la muqueuse colique par les PNN (Hall *et al.* 2011) ce qui se traduit par une augmentation de l'activité MPO colique.

Dans l'étude 1, la plupart des modifications de populations cellulaires ont été détectées dans les ganglions mésentériques et peu de modifications ont été observées dans les plaques de Peyer. Par contre, dans l'étude 2, la plupart des mouvements cellulaires se font dans les plaques de Peyer. Une diminution des lymphocytes B est observée à ce niveau que ce soit lors de la consommation de verveine odorante seule, de DSS seul ou des deux associés. Dans les plaques de Peyer, le DSS induit une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et une augmentation des lymphocytes T CD8⁺, modifications non corrigées par la consommation de l'infusé. Ces différences de résultats peuvent laisser supposer que le stade inflammatoire n'est pas le même dans les deux études. En effet, le développement de la réponse immunitaire intestinale passe par l'endocytose des antigènes par les cellules présentatrices d'antigène dans les plaques de Peyer, ces cellules gagnant ensuite les ganglions mésentériques via les vaisseaux lymphatiques efférents (Ramiro-Puig *et al.* 2008). Ainsi, une modification des populations cellulaires dans les plaques de Peyer pourrait être antérieure à une activation des cellules dans les ganglions mésentériques. L'inflammation induite par le DSS à 4% pendant 7 jours était moins marquée (score histologique) lors de la seconde étude, ce qui pourrait en partie expliquer les variations observées dans les mouvements cellulaires au sein des structures lymphoïdes secondaires entre les deux études.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'infusé de verveine odorante à 40 g/l soit plus à même de moduler la réaction immunitaire intestinale que l'infusé dilué. Cependant, les mécanismes exacts de la réaction immunitaire intestinale ainsi que l'implication des

structures lymphoïdes secondaires dans ce phénomène étant encore mal connus, et compte tenu des données dont nous disposons, il est difficile d'évaluer plus précisément le rôle potentiel de l'infusé sur les mécanismes immunitaires à ce niveau.

Effet de la consommation d'infusé de verveine odorante sur le stress oxydant lors d'une inflammation intestinale

Dans l'inflammation intestinale, l'implication des cellules immunitaires et en particulier des PNN et des macrophages est associée à une augmentation des EROs dans la muqueuse intestinale (Keshavarzian *et al.* 1992). Par ailleurs, les polyphénols sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Roussel *et al.* 2005) et l'infusé de verveine odorante a montré sa capacité de piégeage des EROs (Valentao *et al.* 2002; Bilia *et al.* 2008). Celles-ci sont en partie métabolisées par les enzymes antioxydantes : SOD, CAT et GPx (Kruidenier *et al.* 2002). Il a été montré que les polyphénols pouvaient également agir sur l'activité de ces enzymes *in vivo* (Stevenson *et al.* 2007). Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à différents paramètres du stress oxydant : défenses antioxydantes et altérations oxydatives.

Conformément à ce qui est fréquemment décrit chez les patients atteints de MICI ou dans les modèles d'inflammation intestinale (Dagli *et al.* 1997; Oh *et al.* 2006), nous avons observé dans l'étude 1 une diminution significative de l'activité SOD chez les animaux recevant le DSS. Par contre, cette diminution n'est pas retrouvée dans l'étude 2 ni après 9 jours de DSS (Etude 3). Ce maintien du niveau d'activité dans les études 2 et 3 pourrait être en partie dû au fait que l'inflammation est moins sévère que lors de l'étude 1. En effet, une corrélation négative entre concentration en SOD dans la muqueuse et sévérité de l'inflammation a été montrée chez des patients atteints de RCH (Dagli *et al.* 1997). Tandis que la consommation de l'infusé à forte dose ne corrige pas la baisse d'activité SOD induite par le DSS après 7 jours (Etude 1), on observe que la verveine odorante à faible dose stimule l'activité SOD en situation inflammatoire ou non (Etude 2). Il a été montré que différents polyphénols tels que la lutéoline, le resvératrol ou un extrait de *Ginkgo biloba* stimulent l'activité SOD dans différentes situations inflammatoires au niveau du côlon (Zhou *et al.* 2006; Ashokkumar *et al.* 2008; Yao *et al.* 2010). L'extrait de *Ginkgo biloba* diminue également la peroxydation lipidique au niveau du côlon (Zhou *et al.* 2006). De plus, il a été montré qu'un traitement par la SOD chez le rat TNBS induisait une réduction dose-dépendante du score histologique, de l'activité MPO et de la peroxydation lipidique (Segui *et*

al. 2004). Nous avons observé un lien similaire dans l'étude 2 : l'infusé de verveine stimule la SOD et diminue le taux de MDA colique en situation inflammatoire ou non. Une diminution de la peroxydation lipidique au niveau colique a également été mise en évidence avec des polyphénols purifiés (lutéoline, curcumine, quercitrine) ou des extraits végétaux riches en polyphénols (Sanchez de Medina *et al.* 2002; Ashokkumar *et al.* 2008; Arafa *et al.* 2009). Curieusement, au cours de l'étude 3 la consommation de verveine faible dose seule induit une diminution de l'activité SOD sans modification de celle-ci lors de l'ajout de DSS. Cet effet est en contradiction avec l'augmentation d'activité mise en évidence au cours de l'étude 2. A notre connaissance, seule l'étude de Kim *et al.* menée chez la souris ICR recevant des polyphénols de thé vert à 1% dans l'alimentation a décrit une telle diminution d'activité SOD (Kim *et al.* 2010). Cependant la quantité de polyphénols consommée lors de nos études avec l'infusé à faible dose est de l'ordre de 0,01% de l'alimentation. Une étude complémentaire évaluant l'effet des différentes doses de polyphénols de la verveine sur l'activité SOD dans le temps serait nécessaire afin de préciser l'effet sur cette enzyme.

L'activité GPx n'est pas significativement modifiée par le DSS bien qu'une tendance à l'augmentation soit observée dans le groupe DSS dans l'étude 1. Les effets de l'inflammation sur l'activité GPx sont variables : certains auteurs décrivent une diminution d'activité de l'enzyme dans des conditions inflammatoires (Ashokkumar *et al.* 2008; Yao *et al.* 2010), tandis que d'autres observent une augmentation de l'activité GPx lors d'une colite, que ce soit avec le modèle DSS (Korkina *et al.* 2003) ou avec le modèle TNBS (Dost *et al.* 2009). Celle-ci peut être associée à une diminution de l'activité glutathion réductase (GR), ce qui favorise potentiellement le déséquilibre entre GSH/GSSG en faveur du glutathion oxydé (Dost *et al.* 2009). Nous avons observé après 9 jours de DSS une diminution d'activité de la GR, ce qui pourrait induire une déplétion en GSH. Or le taux de GSH colique et l'activité GPx ne sont pas modifiés ce qui limite l'impact de cette diminution d'activité induite par le DSS.

Quelles que soient les conditions, l'infusé de verveine ne modifie pas l'activité GPx. Une augmentation de cette activité a cependant été décrite lors de l'administration de lutéoline (Ashokkumar *et al.* 2008) ou de resvératrol (Yao *et al.* 2010). D'autre part, la consommation des infusés de verveine odorante chez les rats recevant du DSS pendant 9 jours a permis de corriger la baisse d'activité de la GR observée au cours de l'inflammation. Peu de données sont actuellement disponibles concernant l'effet des polyphénols sur l'activité GR dans la

muqueuse colique, hormis l'effet stimulant de l'acide gallique au cours de la carcinogénèse chez le rat (Giftson *et al.* 2010). Ainsi, l'interprétation de la baisse de l'activité GR lors de la consommation des infusés seuls dans l'étude 3 est difficile, d'autant que cet effet n'est pas retrouvé dans l'étude 2. Cependant, il a été montré *in vitro* que les polyphénols de l'infusé de verveine odorante avaient des propriétés de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux (Bilia *et al.* 2008; Funes *et al.* 2009), pouvant ainsi assumer en partie la fonction du glutathion. Lors de l'inflammation, les polyphénols permettraient une réactivité de l'enzyme favorisant le recyclage du glutathion en cas d'oxydation massive de celui-ci.

La majorité des études ont montré une déplétion de la muqueuse en glutathion lors de l'inflammation colique que ce soit chez l'homme (Buffinton *et al.* 1995) ou chez l'animal (Camuesco *et al.* 2004; Mustafa *et al.* 2006; Ashokkumar *et al.* 2008; Arafa *et al.* 2009). Dans nos études, nous n'avons cependant pas observé de modifications significatives du taux de glutathion colique sous l'influence du DSS ou de l'infusé de verveine. L'induction d'une augmentation du GSH par les polyphénols en situation d'inflammation colique a cependant été mise en évidence dans diverses études : lors de l'administration orale de lutéoline dans le modèle AOM (Ashokkumar *et al.* 2008), de l'injection intrapéritonéale de curcumine (Arafa *et al.* 2009) ou de l'addition de quercitrine dans l'eau de boisson (Camuesco *et al.* 2006). Des effets similaires ont été décrits pour des extraits de *Ginkgo biloba* (Mustafa *et al.* 2006), de *Mangifera indica* (Marquez *et al.* 2010) ou pour l'infusion de *Turnera ulmifolia* (Galvez *et al.* 2006). D'autres composés comme les polyphénols du thé vert sont sans effet sur le taux de glutathion dans la muqueuse colique ; ils favorisent cependant le maintien du ratio GSH/GSSG dans le plasma (Oz *et al.* 2005).

Effet de la consommation d'infusé de verveine odorante sur les taux de cytokines coliques lors d'une inflammation colique

Les taux de différentes cytokines ont été déterminés au niveau colique dans l'étude 3 visant à évaluer l'effet de la consommation préventive d'infusé de verveine odorante à deux doses lors d'une inflammation colique induite par l'administration de DSS pendant 9 jours.

Au cours de l'inflammation intestinale, certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 sont produites et libérées en grande quantité par les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, PNN) et participent aux phénomènes inflammatoires conduisant à l'altération des tissus (Egger *et al.* 2000). Contrairement à ce qui

est le plus souvent décrit (Comalada *et al.* 2005; Kim *et al.* 2008; Kwon *et al.* 2008; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010), nous n'observons pas d'augmentation significative des taux coliques de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 sous l'action du DSS. Cependant, une absence d'élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires a été récemment décrite dans un modèle d'inflammation aiguë au TNBS (Grijo *et al.* 2010). Par ailleurs, une récente étude avec le modèle DSS a montré que les concentrations de ces cytokines variaient entre la muqueuse et la musculuse du côlon (Shi *et al.* 2011). Ainsi, une augmentation significative de l'IL-1 β et du TNF- α était observée uniquement dans la muqueuse tandis qu'aucune élévation du taux d'IL-6 n'était détectée (Shi *et al.* 2011). Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence une absence de corrélation entre intensité d'infiltration par les cellules immunitaires et concentration des médiateurs de l'inflammation (Shi *et al.* 2011). Ainsi nous pouvons envisager que nos analyses étant effectuées sur côlon total et en situation d'inflammation modérée, les variations des taux de cytokines sont peut-être trop faibles pour être détectées. De plus, nous observons une forte variabilité individuelle au sein des groupes ce qui a été précédemment rapporté au cours d'une inflammation modérée (Kim *et al.* 2010).

Concernant l'effet de la consommation préventive de l'infusé de verveine odorante, on observe cependant une diminution significative des taux d'IL-6 et de TNF- α dans le côlon des rats du groupe V40-DSS. On peut noter dans le même groupe une tendance à la diminution du taux d'IL-1 β . Ces trois cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle central dans le développement de l'inflammation. Leur fixation sur leurs récepteurs membranaires induit la stimulation du facteur de transcription NF- κ B (Joyce *et al.* 2001) qui joue un rôle central dans les réponses inflammatoires, immunitaires, prolifératives et apoptotiques d'une cellule soumise à différents stimuli. Ce facteur de transcription coordonne l'expression de nombreux gènes codant pour ces mêmes cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6 et TNF- α) mais également pour les chémokines, les molécules d'adhésion et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Santangelo *et al.* 2007). Ainsi la diminution du taux de ces cytokines pro-inflammatoires par les polyphénols pourrait permettre de limiter le développement de l'inflammation ainsi que ses conséquences. Lors de l'inflammation intestinale, les taux de TNF- α et d'IL-1 β peuvent être réduits par l'administration de verbascoside (Mazzon *et al.* 2009) ou de resvératrol (Martin *et al.* 2004; Martin *et al.* 2006; Sanchez-Fidalgo *et al.* 2010). De tels effets ont également été observés lors de l'administration d'extraits végétaux comme le *Ginkgo biloba* qui réduit les taux d'IL-6 et de TNF- α (Zhou *et al.* 2006) ou un extrait de *Patrinia scabiosaefolia* qui diminue l'IL-1 β (Cho *et al.* 2010). A l'opposé, il a également été

observé que des extraits de polyphénols du thé vert pouvaient induire une augmentation des taux de ces cytokines lors de l'inflammation intestinale (Kim *et al.* 2010).

Variabilité du modèle expérimental choisi

Le modèle expérimental d'inflammation intestinale induite par l'administration de DSS dans l'eau de boisson chez les rongeurs est un des modèles les plus couramment utilisés dans les travaux portant sur les maladies inflammatoires intestinales (Solomon *et al.* 2010). Facile à mettre en place, il est couramment décrit comme reproductible (Solomon *et al.* 2010). Cependant, des problèmes de variabilité entre différentes souches au sein d'une même espèce animale ainsi qu'entre les individus d'une même souche ont été évoqués, contraignant à l'utilisation d'un nombre élevé d'animaux afin de mettre en évidence des différences significatives (Hindryckx *et al.* 2010). Par ailleurs, le meilleur moment pour le sacrifice des animaux et l'évaluation de l'inflammation n'est pas toujours facile à déterminer (Hindryckx *et al.* 2010). Dans nos études, l'induction d'une inflammation modérée plus adaptée à une approche nutritionnelle a également été associée à une forte variabilité des paramètres de l'inflammation.

La variabilité du modèle DSS peut s'observer sur plusieurs paramètres. L'apparition de diarrhée et de saignements rectaux fait partie des paramètres cliniques permettant de suivre le développement de l'inflammation intestinale. Selon les espèces, les souches et les concentrations de DSS choisies, les délais d'apparition de ces signes varient. Ces délais peuvent également varier malgré des conditions expérimentales identiques : chez des rats Wistar de 200 g recevant du DSS à 5%, les premiers saignements sont détectés au 5^{ème} jour (Pelissier *et al.* 2006) ou au 3^{ème} jour (Korkina *et al.* 2003). Lors de nos différentes études, nous avons observé une variabilité dans le délai d'apparition de ces signes (à partir du 5^{ème}, 6^{ème} ou 8^{ème} jour selon les expérimentations) mais également dans le nombre d'individus les présentant (de 0 à 33% des animaux recevant le DSS seul).

L'évolution pondérale des animaux dans ce modèle est également variable bien qu'une perte de poids soit couramment décrite (Solomon *et al.* 2010). Après administration de DSS à 5%, des rats Sprague-Dawley de 575 g commencent à perdre du poids à compter du 5^{ème} jour (Mercier *et al.* 2002) tandis que des rats Wistar de 135 g perdent du poids dès le 2^{ème} jour (Kullmann *et al.* 2001). Par ailleurs, aucune perte de poids n'est observée après

consommation de DSS à 4% pendant 9 jours par des rats Wistar de 170 g (Holma *et al.* 2007). Des observations similaires ont été faites chez des souris ICR : après 6 jours de DSS à 2%, aucune perte de poids n'est observée (Kim *et al.* 2010) tandis qu'avec du DSS à 5%, une perte de poids apparaît dès le 5^{ème} jour (Kwon *et al.* 2005a). Au cours de nos études, toutes réalisées avec du DSS à 4%, nous n'avons pas observé de perte de poids mais une variabilité dans la prise de poids. Lors de l'étude 1, le DSS la diminue de 35%, au cours de l'étude 2 de 51% et au cours de l'étude 3 de 46%. Il existe ainsi une variabilité nette entre les deux premières études menées dans les mêmes conditions et l'augmentation de 2 jours au cours de l'étude 3 n'a pas limité davantage le gain de poids corporel. L'influence du poids initial des animaux a également été soulignée par Koetzner *et al.* qui n'observent pas de perte de poids chez des rats Sprague-Dawley de 300-350 g recevant du DSS à 5% pendant 8 jours (Koetzner *et al.* 2010). La sévérité de l'inflammation serait non seulement liée à la concentration en DSS dans la boisson mais surtout à la quantité de DSS consommée rapportée au poids des animaux (Vowinkel *et al.* 2004). Cette dernière étude a montré que l'activité de la MPO et les atteintes histologiques augmentaient fortement lorsque la charge en DSS dépassait le seuil 30 mg/g de poids vif chez la souris recevant du DSS pendant 7 jours. Le calcul de cette charge (cf. chapitre I.D.7.b.2, p 45) dans les groupes DSS de nos études montre qu'il s'élève à $22,9 \pm 1,03$ mg/g de poids vif dans l'étude 1 et à $24,9 \pm 1,03$ mg/g de poids vif dans l'étude 2. Concernant l'étude 3, la charge en DSS ne peut pas être calculée sur 9 jours pour être comparée aux deux premières études. La détermination de cette valeur sur les 7 premiers jours d'administration du DSS donne une valeur moyenne de $26,8 \pm 0,79$ mg/g de poids vif. La quantité de DSS consommée rapportée au poids initial des animaux a donc peu varié entre les trois études. Considérant l'ensemble des marqueurs mesurés dans nos études, qui ont été peu modifiés dans les conditions d'inflammation choisies, il semblerait qu'un pourcentage de DSS de 4% chez des rats dont le poids moyen au début de l'induction de l'inflammation est d'environ 328 g ne soit pas suffisant pour dépasser le seuil d'inflammation décrit par Vowinkel *et al.* (2004). La variabilité s'observe également au niveau des atteintes histologiques. Le score histologique est de 12,4 UA dans l'étude 1 et plus faible dans les études 2 (6,94 UA) et 3 (5,78 UA). De nouveau, on note une absence de reproductibilité entre les deux études menées dans les mêmes conditions ainsi qu'une absence d'effet de l'allongement de la phase expérimentale sur la sévérité de l'inflammation. Associé à cela, le DSS n'a induit une diminution de l'activité SOD que lors de l'étude 1 lorsque le score histologique est élevé et il a été montré que ces paramètres pouvaient être liés (Segui *et al.* 2004). L'ensemble de ces données semble indiquer que ce modèle nécessite d'adapter au

mieux la concentration de DSS au poids initial des animaux afin d'induire une inflammation suffisamment sévère pour pouvoir mesurer des variations des marqueurs. Nous avons par ailleurs observé de fortes variations entre les individus avec des scores histologiques pouvant aller de 6 UA à 22,3 UA dans un même groupe de 12 individus recevant du DSS (Etude 1). Il est donc nécessaire, comme cela a été récemment précisé (Hindryckx *et al.* 2010), de travailler avec un nombre d'individus conséquent afin d'atténuer la variabilité interindividuelle dans ce modèle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer l'effet d'une consommation régulière d'infusé de verveine odorante riche en polyphénols sur l'inflammation intestinale dans un modèle expérimental d'inflammation colique induite par le sulfate de dextran sodique chez le rat. Pour cela, nous avons déterminé les atteintes histologiques, différents marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant et caractérisé les populations de cellules immunitaires dans le sang et les structures lymphoïdes secondaires associées à l'intestin. De plus, nous avons également étudié l'excrétion urinaire des polyphénols de l'infusé de verveine en conditions physiologique ou inflammatoire.

Ces travaux ont montré qu'une faible proportion des polyphénols de l'infusé de verveine odorante est excrétée dans l'urine et que cette excrétion n'est pas influencée par l'inflammation intestinale. Les polyphénols non absorbés pourraient alors arriver en quantité importante dans le côlon et offrir ainsi une protection lors de l'inflammation. Cependant, l'excrétion d'acides phénoliques résultant du métabolisme microbien n'a pas pu être déterminée. En particulier, l'apport conséquent d'acide férulique par le régime alimentaire n'a pas permis de quantifier l'excrétion de cet acide phénolique résultant du métabolisme des polyphénols de la verveine odorante. Des études complémentaires de biodisponibilité à l'aide d'un régime semi-synthétique sont actuellement en cours au laboratoire et devraient permettre d'identifier et de quantifier plus précisément les différents métabolites urinaires des polyphénols de la verveine odorante.

Nous avons choisi d'administrer aux rats un infusé de verveine odorante préparé selon la méthode « traditionnelle » de l'infusion. Nous avons observé certaines variations dans les quantités de polyphénols extraits ainsi qu'une certaine instabilité du verbascoside dans l'infusé. Il serait alors intéressant, afin de caractériser plus précisément les effets des polyphénols de la verveine odorante, de tester les effets d'extraits réalisés de manière plus standardisée et de maîtriser les quantités consommées par les rats en administrant des doses précises de polyphénols. Cependant ceci s'éloignerait de l'approche nutritionnelle choisie consistant en l'administration de l'infusé *ad libitum* comme boisson.

Au cours de nos travaux, nous avons observé de nombreuses variations dans les effets du DSS. Il est ainsi apparu qu'il serait intéressant d'adapter la concentration de DSS dans l'eau de boisson au poids des animaux. Ainsi une étude comparative de l'inflammation induite par différentes concentrations de DSS sur une durée donnée permettrait de déterminer la meilleure concentration à utiliser afin d'induire une inflammation suffisamment marquée pour observer des effets significatifs et mettre en évidence l'activité éventuelle des polyphénols testés. Enfin, une étude de la cinétique d'apparition de l'inflammation lors de la consommation préventive de ces polyphénols pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

La consommation des infusés (faible et forte dose) a induit un effet protecteur sur divers paramètres cliniques et marqueurs de l'inflammation. Lorsque l'induction de l'inflammation est limitée à 7 jours, les infusés à 40 g/l et 4 g/l permettent de limiter le nombre d'animaux présentant diarrhée et saignements rectaux et de retarder l'apparition de tels signes. De plus, ces infusés restaurent le gain de poids corporel et limitent la rétraction du côlon. Cependant, seul l'infusé à forte dose (40 g/l) permet de réduire les altérations histologiques de la muqueuse. Lorsque l'inflammation est induite sur 9 jours, peu d'effets protecteurs sur ces paramètres ont été observés. Par contre, lorsque l'on considère l'activité de la MPO, marqueur de la colonisation de la muqueuse par les PNN, les deux infusés n'ont limité l'activité de cette enzyme que lors de l'inflammation de 9 jours.

Ces études ont également permis de montrer que la verveine odorante est en mesure de moduler les populations de cellules immunitaires dans les structures lymphoïdes secondaires et en particulier les populations lymphocytaires B et T CD8+. Les effets observés sont plus nombreux après consommation de la verveine à forte dose, en particulier dans les ganglions mésentériques. La consommation de l'infusé faiblement dosé a des effets plus discrets. Cependant, l'inflammation étant moins marquée au cours de l'étude 2, l'effet d'un stade inflammatoire différent n'est pas à exclure. Afin de préciser ces résultats, il serait intéressant de caractériser plus spécifiquement les sous-populations de lymphocytes B et T en particulier en terme de fonctions régulatrices. Par ailleurs, une mise en culture des cellules extraites des structures lymphoïdes secondaires permettrait également d'évaluer l'effet de l'infusé sur la capacité de production par ces cellules de cytokines pro- et anti-inflammatoires, molécules de régulation de l'inflammation. Malgré l'absence d'augmentation des cytokines pro-

inflammatoires par le DSS, l'infusé de verveine à forte dose diminue les taux d'IL-6 et d'IL-1 β dans les muqueuses lors de l'inflammation. L'exploration de ces effets par l'analyse de l'expression des ARNm des cytokines ainsi que l'évaluation de l'effet de la verveine sur l'activité du facteur de transcription NF- κ B dont dépend l'expression des gènes de ces cytokines seraient également intéressantes à réaliser.

Par ailleurs, l'infusé à 4 g/l permet d'augmenter l'activité SOD et de diminuer la peroxydation lipidique due à l'inflammation colique. Ces effets sont particulièrement intéressants dans la mesure où les altérations oxydatives prédisposent à long terme aux phénomènes de carcinogenèse. Au cours d'une inflammation de 9 jours, cet infusé n'a pas montré cet effet anti-oxydant, mais l'infusé à 40 g/l a corrigé la réduction d'activité GR induite par l'inflammation. Ces effets antioxydants sont peu nombreux au vu de l'ensemble des effets décrits dans la littérature. Cependant, il n'est pas à exclure que l'inflammation modérée que nous avons choisi d'induire n'ait pas conduit à de fortes altérations oxydatives comme le laisse penser le peu de modifications des paramètres oxydatifs par l'agent inflammatoire.

Nous avons ainsi montré que la consommation préventive d'un infusé de verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton), traditionnellement consommé pour ses propriétés digestives et antispasmodiques, pouvait offrir des effets protecteurs au cours de l'inflammation en agissant sur les altérations de la muqueuse colique, sur l'immunité intestinale ainsi que sur différents facteurs du stress oxydant. Cependant, il est également apparu que ces effets étaient soumis à d'importantes variations en fonction de la concentration de l'infusé mais également de la sévérité de l'inflammation induite. Des études complémentaires menées avec des extraits standardisés de polyphénols de verveine odorante sur un modèle d'inflammation intestinale plus marqué pourrait permettre de mieux caractériser ces effets protecteurs en particulier au niveau des voies de signalisation impliquées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abreu, I.A. and D.E. Cabelli (2010). "Superoxide dismutases--a review of the metal-associated mechanistic variations." Biochim Biophys Acta **1804**: 263-274.
- Adam, A., V. Crespy, M.A. Levrat-Verny, *et al.* (2002). "The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats." J Nutr **132**: 1962-1968.
- Adlercreutz, H. and W. Mazur (1997). "Phyto-oestrogens and Western diseases." Ann Med **29**: 95-120.
- Ahern, P.P., A. Izcue, K.J. Maloy, *et al.* (2008). "The interleukin-23 axis in intestinal inflammation." Immunol Rev **226**: 147-159.
- Ahmad, N., S. Gupta and H. Mukhtar (2000). "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells." Arch Biochem Biophys **376**: 338-346.
- Aktan, F. (2004). "iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation." Life Sci **75**: 639-653.
- Alex, P., N.C. Zachos, T. Nguyen, *et al.* (2009). "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **15**: 341-352.
- Alzoughaibi, M.A., I.A. Al Mofleh and A.M. Al-Jebreen (2007). "Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease." Saudi J Gastroenterol **13**: 187-190.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 7915-7922.
- Amiot, M.J., M. Tacchini, S.Y. Aubert, *et al.* (1995). "Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymic browning of pear fruits." J Agric Food Chem **43**: 1132-1137.
- Anderson, R.A. and M.M. Polansky (2002). "Tea enhances insulin activity." J Agric Food Chem **50**: 7182-7186.
- Arafa, H.M., R.A. Hemeida, A.I. El-Bahrawy, *et al.* (2009). "Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model." Food Chem Toxicol **47**: 1311-1317.
- Arai, Y., H. Takanashi, H. Kitagawa, *et al.* (1998). "Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice." Cytokine **10**: 890-896.
- Araki, Y., H. Sugihara and T. Hattori (2006). "In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis." Oncol Rep **16**: 1357-1362.
- Arts, I.C. and P.C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." Am J Clin Nutr **81**: 317S-325S.
- Ashokkumar, P. and G. Sudhandiran (2008). "Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis." Biomed Pharmacother **62**: 590-597.
- Atoui, A.K., A. Mansouri, G. Boskou, *et al.* (2005). "Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile." Food Chem **89**: 27-36.
- Atreya, I., R. Atreya and M.F. Neurath (2008). "NF-kappaB in inflammatory bowel disease." J Intern Med **263**: 591-596.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2001). "Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion." Xenobiotica **31**: 469-497.
- Baba, H., Y. Ohtsuka, H. Haruna, *et al.* (2009). "Studies of anti-inflammatory effects of Rooibos tea in rats." Pediatr Int **51**: 700-704.

- Bach, J.F. (2002). "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." *N Engl J Med* **347**: 911-920.
- Bamias, G., M.R. Nyce, S.A. De La Rue, *et al.* (2005). "New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease." *Ann Intern Med* **143**: 895-904.
- Barthelman, M., W.B. Bair, 3rd, K.K. Stickland, *et al.* (1998). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity." *Carcinogenesis* **19**: 2201-2204.
- Baskol, M., G. Baskol, D. Kocer, *et al.* (2008). "Advanced oxidation protein products: a novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis." *J Clin Gastroenterol* **42**: 687-691.
- Beatty, E.R., J.D. O'Reilly, T.G. England, *et al.* (2000). "Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects." *Br J Nutr* **84**: 919-925.
- Bengmark, S. (2004). "Acute and "chronic" phase reaction-a mother of disease." *Clin Nutr* **23**: 1256-1266.
- Benzie, I.F.F. and J.J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." *Anal Biochem* **239**: 70-76.
- Beyer, R.E. (1994). "The relative essentiality of the antioxidative function of coenzyme Q - the interactive role of DT-diaphorase." *Mol Aspects Med* **15**: s117-129.
- Bhaskar, L., B.S. Ramakrishna and K.A. Balasubramanian (1995). "Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis." *J Gastroenterol Hepatol* **10**: 140-143.
- Bilia, A.R., M. Giomi, M. Innocenti, *et al.* (2008). "HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity." *J Pharm Biomed Anal* **46**: 463-470.
- Blanc, M., C. Moinard and L. Cynober (2005). "Monoxyde d'azote." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: p 25-43.
- Blumberg, R.S., L.J. Saubermann and W. Strober (1999). "Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease." *Curr Opin Immunol* **11**: 648-656.
- Bok, S.H., S.H. Lee, Y.B. Park, *et al.* (1999). "Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA : cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids." *J Nutr* **129**: 1182-1185.
- Bonina, F.P., C. Leotta, G. Scalia, *et al.* (2002). "Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract." *Diabetes Nutr Metab* **15**: 14-19.
- Boulton, D.W., U.K. Walle and T. Walle (1998). "Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins." *J Pharm Pharmacol* **50**: 243-249.
- Boyle, S.P., V.L. Dobson, S.J. Duthie, *et al.* (2000). "Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal." *Eur J Nutr* **39**: 213-223.
- Brandtzaeg, P., H.S. Carlsen and T.S. Halstensen (2006). "The B-cell system in inflammatory bowel disease." *Adv Exp Med Biol* **579**: 149-167.
- Brigelius-Flohe, R. and A. Kipp (2009). "Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1555-1568.
- Brigelius-Flohe, R. and M.G. Traber (1999). "Vitamin E: function and metabolism." *FASEB J* **13**: 1145-1155.
- Brimnes, J., M. Allez, I. Dotan, *et al.* (2005). "Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease." *J Immunol* **174**: 5814-5822.
- Bruneton, J. (2009). "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales." Paris. Lavoisier. 1269 p

- Buffinton, G.D. and W.F. Doe (1995). "Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease." Free Radic Biol Med **19**: 911-918.
- Burda, S., W. Oleszek and C.Y. Lee (1990). "Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage." J Agric Food Chem **38**: 945-948.
- Byun, H.S., J.K. Song, Y.R. Kim, *et al.* (2008). "Caspase-8 has an essential role in resveratrol-induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes." Rheumatology (Oxford) **47**: 301-308.
- Camacho-Barquero, L., I. Villegas, J.M. Sánchez-Calvo, *et al.* (2007). "Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis." Int Immunopharmacol **7**: 333-342.
- Camuesco, D., M. Comalada, A. Concha, *et al.* (2006). "Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis." Clin Nutr **25**: 466-476.
- Camuesco, D., M. Comalada, M.E. Rodriguez-Cabezas, *et al.* (2004). "The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression." Br J Pharmacol **143**: 908-918.
- Canali, R., F. Vignolini, F. Nobili, *et al.* (2000). "Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat." Free Radic Biol Med **28**: 1661-1670.
- Cao, G., H.U. Muccitelli, C. Sanchez-Moreno, *et al.* (2001). "Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women : a pharmacokinetic study." Am J Clin Nutr **73**: 920-926.
- Cao, G., R.M. Russell, N. Lischner, *et al.* (1998). "Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women." J Nutr **128**: 2383-2390.
- Carnat, A., A.P. Carnat, D. Fraisse, *et al.* (1999). "The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea." Fitoterapia **70**: 44-49.
- Carrier, J., E. Aghdassi, J. Cullen, *et al.* (2002). "Iron supplementation increases disease activity and vitamin E ameliorates the effect in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis." J Nutr **132**: 3146-3150.
- Casalini, C., M. Lodovici, C. Briani, *et al.* (1999). "Effect of complex polyphenols and tannins from red wine (WCPT) on chemically induced oxidative DNA damage in the rat." Eur J Nutr **38**: 190-195.
- Cassidy, A., B. Hanley and R.M. Lamuela-Raventos (2000). "Isoflavones, lignans and stilbenes : origins, metabolism and potential importance to human health." J Sci Food Agric **348**.
- Castagnini, C., C. Luceri, S. Toti, *et al.* (2009). "Reduction of colonic inflammation in HLA-B27 transgenic rats by feeding Marie Menard apples, rich in polyphenols." Br J Nutr **102**: 1620-1628.
- Ceciliani, F., A. Giordano and V. Spagnolo (2002). "The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins." Protein Pept Lett **9**: 211-223.
- Chen, T., L.P. Li, X.Y. Lu, *et al.* (2007). "Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of *Chrysanthemum morifolium* extract." J Agric Food Chem **55**: 273-277.
- Chen, Z., M. Chen, H. Pan, *et al.* (2011). "Role of catechol-O-methyltransferase in the disposition of luteolin in rats." Drug Metab Dispos **39**: 667-674.

- Cheng, J.T. and I.M. Liu (2000). "Stimulatory effect of caffeic acid on alpha1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**: 122-127.
- Chiechi, L.M., G. Secreto, M. D'Amore, *et al.* (2002). "Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial." Maturitas **42**: 295-300.
- Chiodini, R.J., H.J. Van Kruiningen, W.R. Thayer, *et al.* (1984). "Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease." Dig Dis Sci **29**: 1073-1079.
- Cho, E.J., J.S. Shin, Y.S. Noh, *et al.* (2010). "Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis." J Ethnopharmacol.
- Chung, H.L., G.G. Yue, K.F. To, *et al.* (2007). "Effect of *Scutellariae radix* extract on experimental dextran-sulfate sodium-induced colitis in rats." World J Gastroenterol **13**: 5605-5611.
- Clifford, M.N. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates : nature, occurrence and dietary burden." Malden, MA, ETATS-UNIS. Wiley. 138 p
- Clifford, M.N. (2000a). "Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden." J Sci Food Agric **80**: 1063-1072.
- Clifford, M.N. (2000b). "Chlorogenic acids and other cinnamates : nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism." Malden, MA, ETATS-UNIS. Wiley. 348 p
- Clifford, M.N. and A. Scalbert (2000). "Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden." J Sci Food Agric **80**: 1118-1125.
- Cohen, M.L. (2000). "Changing patterns of infectious disease." Nature **406**: 762-767.
- Comalada, M., D. Camuesco, S. Sierra, *et al.* (2005). "In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway." Eur J Immunol **35**: 584-592.
- Cong, Y., S.L. Brandwein, R.P. McCabe, *et al.* (1998). "CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease." J Exp Med **187**: 855-864.
- Cooper, H.S., S.N. Murthy, R.S. Shah, *et al.* (1993). "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." Lab Invest **69**: 238-249.
- Coward, L., M. Smith, M. Kirk, *et al.* (1998). "Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing." Am J Clin Nutr **68**: 1486S-1491S.
- Coxam, V. (2005). "New advances in osteoporosis nutritional prevention." Med Sci (Paris) **21**: 297-301.
- Crespy, V., C. Morand, C. Besson, *et al.* (2003). "The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound." Am J Physiol **284**: G980-988.
- Crespy, V., C. Morand, C. Besson, *et al.* (2001). "Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats." J Nutr **131**: 2109-2114.
- Crespy, V., C. Morand, C. Manach, *et al.* (1999). "Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen." Am J Physiol **277**: G120-126.
- Crozier, A., I.B. Jaganath and M.N. Clifford (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." Nat Prod Rep **26**: 1001-1043.
- Cruz, T., J. Galvez, M.A. Ocete, *et al.* (1998). "Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats." Life Sci **62**: 687-695.
- Dagli, Ü., M. Balk, D. Yücel, *et al.* (1997). "The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis **3**: 260-264.

- Damiani, C.R., C.A. Benetton, C. Stoffel, *et al.* (2007). "Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium." J Gastroenterol Hepatol **22**: 1846-1851.
- Danese, S. and C. Fiocchi (2006). "Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **12**: 4807-4812.
- Dangles, O., C. Dufour and S. Bret (1999). "Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin." J Chem Soc: 737-744.
- Dangles, O., C. Dufour, C. Manach, *et al.* (2001). "Binding of flavonoids to plasma proteins." Methods Enzymol **335**: 319-333.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, *et al.* (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Ann Ist Super Sanita **43**: 348-361.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, *et al.* (1998). "Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease." Gastroenterology **115**: 1405-1413.
- Darvesh, A.S., R.T. Carroll, A. Bishayee, *et al.* (2010). "Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents." Expert Rev Neurother **10**: 729-745.
- Day, A.J., F.J. Canada, J.C. Diaz, *et al.* (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." FEBS Lett **468**: 166-170.
- Day, A.J., M.S. DuPont, S. Ridley, *et al.* (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity." FEBS Lett **436**: 71-75.
- Day, A.J., J.M. Gee, M.S. DuPont, *et al.* (2003). "Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter." Biochem Pharmacol **65**: 1199-1206.
- de Kleijn, M.J., Y.T. van der Schouw, P.W. Wilson, *et al.* (2002). "Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: the Framingham study." J Nutr **132**: 276-282.
- Deguchi, Y., A. Andoh, O. Inatomi, *et al.* (2007). "Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis." Dig Dis Sci **52**: 2993-2998.
- Deiana, M., G. Corona, A. Incani, *et al.* (2010). "Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells." Food Chem Toxicol **48**: 3008-3016.
- Del Rio, D., L.G. Costa, M.E. Lean, *et al.* (2010). "Polyphenols and health: what compounds are involved?" Nutr Metab Cardiovasc Dis **20**: 1-6.
- Dembinska-Kiec, A., O. Mykkänen, B. Kiec-Wilk, *et al.* (2008). "Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes." Br J Nutr **99**: ES109-ES117.
- D'Haens, G.R., K. Geboes, M. Peeters, *et al.* (1998). "Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum." Gastroenterology **114**: 262-267.
- Di Castelnuovo, A., S. Rotondo, L. Iacoviello, *et al.* (2002). "Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk." Circulation **105**: 2836-2844.
- Dieleman, L.A., M.J. Palmen, H. Akol, *et al.* (1998). "Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines." Clin Exp Immunol **114**: 385-391.

- Dieleman, L.A., B.U. Ridwan, G.S. Tennyson, *et al.* (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." Gastroenterology **107**: 1643-1652.
- Dijkstra, G., H. Moshage, H.M. van Dullemen, *et al.* (1998). "Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease." J Pathol **186**: 416-421.
- Dinareello, C.A. (2002). "The IL-1 family and inflammatory diseases." Clin Exp Rheumatol **20**: S1-13.
- Ding, M., R. Feng, S.Y. Wang, *et al.* (2006). "Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity." J Biol Chem **281**: 17359-17368.
- Ding, M., Y. Lu, L. Bowman, *et al.* (2004). "Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract." J Biol Chem **279**: 10670-10676.
- Dolara, P., C. Luceri, C. De Filippo, *et al.* (2005). "Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats." Mutat Res **591**: 237-246.
- Donovan, J.L., J.R. Bell, S. Kasim-Karakas, *et al.* (1999). "Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine." J Nutr **129**: 1662-1668.
- Donovan, J.L., V. Crespy, C. Manach, *et al.* (2001). "Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats." J Nutr **131**: 1753-1757.
- dos Reis, S.B., C.C. de Oliveira, S.C. Acedo, *et al.* (2009). "Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract." Phytother Res **23**: 324-329.
- Dost, T., H. Ozkayran, F. Gokalp, *et al.* (2009). "The effect of Hypericum perforatum (St. John's Wort) on experimental colitis in rat." Dig Dis Sci **54**: 1214-1221.
- Dryden, G.W., M. Song and C. McClain (2006). "Polyphenols and gastrointestinal diseases." Curr Opin Gastroenterol **22**: 165-170.
- Duchmann, R., I. Kaiser, E. Hermann, *et al.* (1995). "Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD)." Clin Exp Immunol **102**: 448-455.
- Durak, I., M.H. Yasa, A. Bektas, *et al.* (2000). "Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis." Hepatogastroenterology **47**: 1015-1017.
- Dziedzic, S.Z. and B.J.F. Hudson (1983). "Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils." Food Chemistry **12**: 205-212.
- Egger, B., M. Bajaj-Elliott, T.T. MacDonald, *et al.* (2000). "Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency." Digestion **62**: 240-248.
- Elangovan, V., N. Sekar and S. Govindasamy (1994). "Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis." Cancer Lett **87**: 107-113.
- Elson, C.O., R.B. Sartor, G.S. Tennyson, *et al.* (1995). "Experimental models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **109**: 1344-1367.
- Erdman, J.W., D. Balentine, L. Arab, *et al.* (2007). "Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC." J Nutr **137**: 718S-737S.
- Erkinjuntti, T. and S. Gauthier (2009). "The concept of vascular cognitive impairment." Front Neurol Neurosci **24**: 79-85.
- Erlund, I., E. Meririnne, G. Alfthan, *et al.* (2001). "Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice." J Nutr **131**: 235-241.

- Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl, *et al.* (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." *Free Radic Biol Med* **13**: 341-390.
- Falany, C.N. (1997). "Enzymology of human cytosolic sulfotransferases." *Faseb J* **11**: 206-216.
- Farkas, S., H. Herfarth, M. Rossle, *et al.* (2001). "Quantification of mucosal leucocyte endothelial cell interaction by in vivo fluorescence microscopy in experimental colitis in mice." *Clin Exp Immunol* **126**: 250-258.
- Felgines, C., O. Texier, P. Garcin, *et al.* (2009). "Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet." *Mol Nutr Food Res* **53**: 1098-1103.
- Ferguson, L.R. (2010). "Chronic inflammation and mutagenesis." *Mutat Res* **690**: 3-11.
- Fillatreau, S., D. Gray and S.M. Anderton (2008). "Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology." *8*: 391-397.
- Francis, S.T., K. Head, P.G. Morris, *et al.* (2006). "The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people." *J Cardiovasc Pharmacol* **47 Suppl 2**: S215-220.
- Funes, L., S. Fernández-Arroyo, O. Laporta, *et al.* (2009). "Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract." *Food Chem* **117**: 589-598.
- Galvano, F., L. La Fauci, P. Vitaglione, *et al.* (2007). "Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides." *Ann Ist Super Sanita* **43**: 382-393.
- Galvez, J., G. Coelho, M.E. Crespo, *et al.* (2001). "Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat." *Aliment Pharmacol Ther* **15**: 2027-2039.
- Galvez, J., J. de Souza Gracioso, D. Camuesco, *et al.* (2006). "Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis." *Fitoterapia* **77**: 515-520.
- Garcia-Closas, R., A. Agudo, C.A. Gonzalez, *et al.* (1998). "Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain." *Nutr Cancer* **32**: 154-158.
- Garcia-Lafuente, A., E. Guillamon, A. Villares, *et al.* (2009a). "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease." *Inflamm Res* **58**: 537-552.
- Garcia-Lafuente, A., E. Guillamon, A. Villares, *et al.* (2009b). "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease." *Inflamm Res*.
- Gardès-Albert, M. and D. Jore (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: p 1-23.
- Gaudio, E., G. Taddei, A. Vetusch, *et al.* (1999). "Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects." *Dig Dis Sci* **44**: 1458-1475.
- Gee, J.M., M.S. DuPont, M.J. Rhodes, *et al.* (1998). "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway." *Free Radic Biol Med* **25**: 19-25.
- Gerhauser, C. (2008). "Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components." *Planta Med* **74**: 1608-1624.
- Ghiselli, A., F. Natella, A. Guidi, *et al.* (2000). "Beer increases plasma antioxidant capacity in humans." *J Nutr Biochem* **11**: 76-80.
- Ghiselli, A., M. Serafini, G. Maiani, *et al.* (1995). "A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability." *Free Radic Biol Med* **18**: 29-36.

- Giftson, J.S., S. Jayanthi and N. Nalini (2010). "Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis." Invest New Drugs **28**: 251-259.
- Girardin, S.E., J.P. Hugot and P.J. Sansonetti (2003). "Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing." Trends Immunol **24**: 652-658.
- Gonzalez, R., I. Ballester, R. Lopez-Posadas, *et al.* (2011). "Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation." Crit Rev Food Sci Nutr **51**: 331-362.
- Gonzalez-Gallego, J., M.V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, *et al.* (2010). "Fruit polyphenols, immunity and inflammation." Br J Nutr **104**: S15-S27.
- Goodman, J.E., L.J. Hofseth, S.P. Hussain, *et al.* (2004). "Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease." Environ Mol Mutagen **44**: 3-9.
- Graefe, E.U., J. Wittig, S. Mueller, *et al.* (2001). "Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans." J Clin Pharmacol **41**: 492-499.
- Graham, H.N. (1992). "Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry." Prev Med **21**: 334-350.
- Gratz, R., S. Becker, N. Sokolowski, *et al.* (2002). "Murine monoclonal anti-tNF antibody administration has a beneficial effect on inflammatory bowel disease that develops in IL-10 knockout mice." Dig Dis Sci **47**: 1723-1727.
- Grek, C.L. and K.D. Tew (2010). "Redox metabolism and malignancy." Curr Opin Pharmacol **10**: 362-368.
- Grijo, N.N., R.C. Borra and V.L. Sdepanian (2010). "Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines present in the acute phase of experimental colitis treated with *Saccharomyces boulardii*." Dig Dis Sci **55**: 2498-2504.
- Grisham, M.B. (1994). "Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease." Lancet **344**: 859-861.
- Gruys, E., M.J. Toussaint, T.A. Niewold, *et al.* (2005). "Acute phase reaction and acute phase proteins." J Zhejiang Univ Sci B **6**: 1045-1056.
- Guo, C., G. Cao, E. Sofic, *et al.* (1997). "High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables : relationship to oxygen radical absorbance capacity." J Agric Food Chem **45**: 1787-1796.
- Guo, W., E. Kong and M. Meydani (2009). "Dietary polyphenols, inflammation, and cancer." Nutr Cancer **61**: 807-810.
- Guyot, S., N. Marnet, D. Laraba, *et al.* (1998). "Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*malus domestica* Var. Kermerrien)." J Agric Food Chem **46**: 1698-1705.
- Hadi, S.M., M.F. Ullah, A.S. Azmi, *et al.* (2010). "Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer." Pharm Res **27**: 979-988.
- Hall, L., E. Faivre, A. Quinlan, *et al.* (2011). "Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis." Dig Dis Sci **56**: 79-89.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge (1999). "Free radicals in biology and medicine." New-York. Oxford University Press. 936 p
- Halliwell, B. (1990). "How to characterize a biological antioxidant." Free Radic Res Commun **9**: 1-32.

- Hanai, H., T. Iida, K. Takeuchi, *et al.* (2006). "Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." Clin Gastroenterol Hepatol **4**: 1502-1506.
- Hanauer, S.B. (2006). "Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities." Inflamm Bowel Dis **12 Suppl 1**: S3-9.
- Hausmann, M., F. Obermeier, D.H. Paper, *et al.* (2007). "In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis." Clin Exp Immunol **148**: 373-381.
- Hayek, T., B. Fuhrman, J. Vaya, *et al.* (1997). "Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**: 2744-2752.
- Hegarty, V.M., H.M. May and K.T. Khaw (2000). "Tea drinking and bone mineral density in older women." Am J Clin Nutr **71**: 1003-1007.
- Hendel, J. and O.H. Nielsen (1997). "Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **92**: 1170-1173.
- Hershberg, R.M. and L.F. Mayer (2000). "Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity." Immunol Today **21**: 123-128.
- Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, *et al.* (1994). "Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study." Nutr Cancer **22**: 175-184.
- Hertog, M.G., D. Kromhout, C. Aravanis, *et al.* (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study." Arch Intern Med **155**: 381-386.
- Hindryckx, P., S. Staelens, L. Devisscher, *et al.* (2010). "Longitudinal quantification of inflammation in the murine dextran sodium sulfate-induced colitis model using μ PET/CT." Inflam Bowel Dis (sous presse).
- Hirvonen, T., J. Virtamo, P. Korhonen, *et al.* (2001). "Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland)." Cancer Causes Control **12**: 789-796.
- Hollman, P.C., M.N. Bijsman, Y. van Gameren, *et al.* (1999). "The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man." Free Radic Res **31**: 569-573.
- Hollman, P.C., J.H. de Vries, S.D. van Leeuwen, *et al.* (1995). "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers." Am J Clin Nutr **62**: 1276-1282.
- Hollman, P.C., J.M. van Trijp, M.N. Buysman, *et al.* (1997). "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man." FEBS Lett **418**: 152-156.
- Holma, R., P. Salmenpera, I. Virtanen, *et al.* (2007). "Prophylactic potential of montelukast against mild colitis induced by dextran sulphate sodium in rats." J Physiol Pharmacol **58**: 455-467.
- Holmes, E.W., S.L. Yong, D. Eiznhamer, *et al.* (1998). "Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis." Dig Dis Sci **43**: 1088-1095.
- Horcajada-Molteni, M.N., V. Crespy, V. Coxam, *et al.* (2000). "Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats." J Bone Miner Res **15**: 2251-2258.
- Hotamisligil, G.S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**: 860-867.
- Hsu, F.L., Y.C. Chen and J.T. Cheng (2000). "Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats." Planta Med **66**: 228-230.
- Iantomasi, T., P. Marraccini, F. Favilli, *et al.* (1994). "Glutathione metabolism in Crohn's disease." Biochem Med Metab Biol **53**: 87-91.

- Iba, Y., Y. Sugimoto, C. Kamei, *et al.* (2003). "Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats." Int Immunopharmacol **3**: 485-491.
- Imai, K., K. Suga and K. Nakachi (1997). "Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population." Prev Med **26**: 769-775.
- Ishioka, T., N. Kuwabara, Y. Oohashi, *et al.* (1987). "Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides." Crit Rev Toxicol **17**: 215-244.
- Ishiwa, J., T. Sato, Y. Mimaki, *et al.* (2000). "A citrus flavonoid, nobletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9 / gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts." J Rheumatol **27**: 20-25.
- Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz (2004). "Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **126**: 1634-1648.
- Jackson, S.J. and R.C. Venema (2006). "Quercetin inhibits eNOS, microtubule polymerization, and mitotic progression in bovine aortic endothelial cells." J Nutr **136**: 1178-1184.
- Jin, Y., V.S. Kotakadi, L. Ying, *et al.* (2008). "American ginseng suppresses inflammation and DNA damage associated with mouse colitis." Carcinogenesis **29**: 2351-2359.
- Johnston, K.L., M.N. Clifford and L.M. Morgan (2003). "Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine." Am J Clin Nutr **78**: 728-733.
- Joyce, D., C. Albanese, J. Steer, *et al.* (2001). "NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection." Cytokine Growth Factor Rev **12**: 73-90.
- Jurjus, A.R., N.N. Khoury and J.M. Reimund (2004). "Animal models of inflammatory bowel disease." J Pharmacol Toxicol Methods **50**: 81-92.
- Kaplan, M., T. Hayek, A. Raz, *et al.* (2001). "Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis." J Nutr **131**: 2082-2089.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." Nature **441**: 431-436.
- Karlsen, A., L. Retterstol, P. Laake, *et al.* (2007). "Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults." J Nutr **137**: 1951-1954.
- Karttunen, R., E.J. Breese, J.A. Walker-Smith, *et al.* (1994). "Decreased mucosal interleukin-4 (IL-4) production in gut inflammation." J Clin Pathol **47**: 1015-1018.
- Kaser, A., S. Zeissig and R.S. Blumberg (2010). "Inflammatory bowel disease." Annu Rev Immunol **28**: 573-621.
- Kato, S., K. Itoh, M. Ochiai, *et al.* (2008). "Increased pentosidine, an advanced glycation end-product, in urine and tissue reflects disease activity in inflammatory bowel diseases." J Gastroenterol Hepatol **23**: S140-S145.
- Kauss, T., D. Moynet, J. Rambert, *et al.* (2008). "Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis." Arthritis Res Ther **10**: R19.
- Keshavarzian, A., S. Sedghi, J. Kanofsky, *et al.* (1992). "Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe." Gastroenterology **103**: 177-185.
- Khandhadia, S. and A. Lotery (2010). "Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology." Expert Rev Mol Med **12**: e34.
- Kim, H., H. Kong, B. Choi, *et al.* (2005). "Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease." Pharm Res **22**: 1499-1509.

- Kim, H.P., K.H. Son, H.W. Chang, *et al.* (2004). "Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms." *J Pharmacol Sci* **96**: 229-245.
- Kim, M., A. Murakami, S. Miyamoto, *et al.* (2010). "The modifying effects of green tea polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis in male ICR mice." *Biofactors* **36**: 43-51.
- Kim, Y.H., H.S. Kwon, D.H. Kim, *et al.* (2008). "Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis." *Int Immunopharmacol* **8**: 1695-1702.
- King, R.A. and D.B. Bursill (1998). "Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans." *Am J Clin Nutr* **67**: 867-872.
- Kirkman, H.N. and G.F. Gaetani (2007). "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries." *Trends Biochem Sci* **32**: 44-50.
- Kitajima, S., M. Morimoto and E. Sagara (2002). "A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents." *Exp Anim* **51**: 203-206.
- Kitajima, S., S. Takuma and M. Morimoto (2000). "Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights." *Exp Anim* **49**: 9-15.
- Klatsky, A.L., G.D. Friedman, M.A. Armstrong, *et al.* (2003). "Wine, liquor, beer, and mortality." *Am J Epidemiol* **158**: 585-595.
- Knekt, P., R. Jarvinen, R. Seppanen, *et al.* (1997). "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms." *Am J Epidemiol* **146**: 223-230.
- Knekt, P., J. Kumpulainen, R. Jarvinen, *et al.* (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases." *Am J Clin Nutr* **76**: 560-568.
- Ko, J.K., F.Y. Lam and A.P. Cheung (2005). "Amelioration of experimental colitis by *Astragalus membranaceus* through anti-oxidation and inhibition of adhesion molecule synthesis." *World J Gastroenterol* **11**: 5787-5794.
- Koboziev, I., F. Karlsson and M.B. Grisham (2010). "Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation." *Ann NY Acad Sci* **1207**: E86-E93.
- Koetzner, L., G. Grover, J. Boulet, *et al.* (2010). "Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat." *Dig Dis Sci* **55**: 1278-1285.
- Kohri, T., F. Nanjo, M. Suzuki, *et al.* (2001). "Synthesis of (-)-[4-3H]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration." *J Agric Food Chem* **49**: 1042-1048.
- Korkina, L., M. Suprun, A. Petrova, *et al.* (2003). "The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and Aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats." *Biofactors* **18**: 255-264.
- Koster, H., I. Halsema, E. Scholtens, *et al.* (1981). "Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat in vivo and in isolated hepatocytes. The role of saturation of phenolsulfotransferase." *Biochem Pharmacol* **30**: 2569-2575.
- Kraus, S. and N. Arber (2009). "Inflammation and colorectal cancer." *Curr Opin Pharmacol* **9**: 405-410.
- Krause, M. and R. Galensa (1992). "Bestimmung von Naringenin und Naringenin-Chalkon in Tomatenschalen mit RP-HPLC nach Festphasenextraktion." *Lebensm Unters Forsch* **194**: 29-32.
- Krawisz, J.E., P. Sharon and W.F. Stenson (1984). "Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models." *Gastroenterology* **87**: 1344-1350.
- Kresty, L.A., W.L. Frankel, C.D. Hammond, *et al.* (2006). "Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: interim results

- show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's esophagus patients." *Nutr Cancer* **54**: 148-156.
- Kriegelstein, C.F., W.H. Cerwinka, F.S. Laroux, *et al.* (2001). "Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide." *J Exp Med* **194**: 1207-1218.
- Kruidenier, L. and H.W. Verspaget (2002). "Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous?" *Aliment Pharmacol Ther* **16**: 1997-2015.
- Kryukov, G.V., S. Castellano, S.V. Novoselov, *et al.* (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* **300**: 1439-1443.
- Kubes, P. (2002). "The complexities of leukocyte recruitment." *Semin Immunol* **14**: 65-72.
- Kühnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev Nutr Diet* **24**: 117-191.
- Kühnel, W. (1998). "Appareil digestif." *Atlas de poche d'Histologie*. Paris: p 250-320.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, *et al.* (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." *Cell* **75**: 263-274.
- Kulkarni, A.B., C.G. Huh, D. Becker, *et al.* (1993). "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 770-774.
- Kullmann, F., H. Messmann, M. Alt, *et al.* (2001). "Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats." *International Journal of Colorectal Disease* **16**: 238-246.
- Kunisawa, J. and H. Kiyono (2005). "Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity." *Cell Mol Life Sci* **62**: 1308-1321.
- Kwon, H.S., S.M. Oh and J.K. Kim (2008). "Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis." *Clin Exp Immunol* **151**: 165-173.
- Kwon, K.H., A. Murakami, R. Hayashi, *et al.* (2005a). "Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis." *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 647-654.
- Kwon, K.H., A. Murakami, T. Tanaka, *et al.* (2005b). "Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression." *Biochem Pharmacol* **69**: 395-406.
- Lala, G., M. Malik, C. Zhao, *et al.* (2006). "Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats." *Nutr Cancer* **54**: 84-93.
- Lamartiniere, C.A., M.S. Cotroneo, W.A. Fritz, *et al.* (2002). "Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate." *J Nutr* **132**: 552S-558S.
- Lambert, A.J. and M.D. Brand (2009). "Reactive oxygen species production by mitochondria." *Methods Mol Biol* **554**: 165-181.
- Lampe, J.W. (1999). "Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies." *Am J Clin Nutr* **70**: 475S-490S.
- Lamuela-Raventos, R.M., A.I. Romero-Perez, A.L. Waterhouse, *et al.* (1995). "Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in spanish red vitis vinifera wines." *J Agric Food Chem* **43**: 281-283.
- Laranjinha, J. (2001). "Redox cycles of caffeic acid with alpha-tocopherol and ascorbate." *Methods Enzymol* **335**: 282-295.
- Larrosa, M., A. Gonzalez-Sarrias, M.J. Yanez-Gascon, *et al.* (2010). "Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model

- and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism." J Nutr Biochem **21**: 717-725.
- Larrosa, M., M.J. Yanez-Gascon, M.V. Selma, *et al.* (2009). "Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model." J Agric Food Chem **57**: 2211-2220.
- Lau, F.C., D.F. Bielinski and J.A. Joseph (2007). "Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia." J Neurosci Res **85**: 1010-1017.
- Le Marchand, L., S.P. Murphy, J.H. Hankin, *et al.* (2000). "Intake of flavonoids and lung cancer." J Natl Cancer Inst **92**: 154-160.
- Lee, J.Y., H.S. Kang, B.E. Park, *et al.* (2009). "Inhibitory effects of Geijigajakyak-Tang on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis." J Ethnopharmacol **126**: 244-251.
- Lee, M.J., Z.Y. Wang, H. Li, *et al.* (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**: 393-399.
- Lee, S.H., Y.B. Park, K.H. Bae, *et al.* (1999). "Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in rats." Ann Nutr Metab **43**: 173-180.
- Leenen, R., A.J. Roodenburg, L.B. Tijburg, *et al.* (2000). "A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans." Eur J Clin Nutr **54**: 87-92.
- Lih-Brody, L., S.R. Powell, K.P. Collier, *et al.* (1996). "Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci **41**: 2078-2086.
- Lim, B.O. (2004). "Efficacy of wogonin in the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." Biosci Biotechnol Biochem **68**: 2505-2511.
- Lim, B.O., S.H. Lee, D.K. Park, *et al.* (2003). "Effect of dietary pectin on the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." Biosci Biotechnol Biochem **67**: 1706-1712.
- Liu, S.P., W.G. Dong, D.F. Wu, *et al.* (2003). "Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats." World J Gastroenterol **9**: 2786-2790.
- Lotito, S.B. and B. Frei (2004). "The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids." Free Radic Biol Med **37**: 251-258.
- Lotito, S.B. and B. Frei (2006). "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?" Free Radic Biol Med **41**: 1727-1746.
- Lu, Y. and L.Y. Foo (1997). "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace." Food Chem **59**: 187-194.
- Lubec, G. (1996). "The hydroxyl radical: from chemistry to human disease." J Investig Med **44**: 324-346.
- Luceri, C., G. Caderni, A. Sanna, *et al.* (2002). "Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors." J Nutr **132**: 1376-1379.
- Luceri, C., F. Guglielmi, M. Lodovici, *et al.* (2004). "Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats." Scand J Gastroenterol **39**: 1128-1133.

- Macdonald, T.T. and G. Monteleone (2005). "Immunity, inflammation, and allergy in the gut." Science **307**: 1920-1925.
- Macheix, J.J., A. Fleuriet and P. Sarni-Manchado (2006). "Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles." Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier: p 1-28.
- Magrone, T., A. Tafaro, F. Jirillo, *et al.* (2008). "Elicitation of immune responsiveness against antigenic challenge in age-related diseases: effects of red wine polyphenols." Curr Pharm Des **14**: 2749-2757.
- Mahida, Y.R., K. Wu and D.P. Jewell (1989). "Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease." Gut **30**: 835-838.
- Mahler, M., I.J. Bristol, E.H. Leiter, *et al.* (1998). "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." Am J Physiol **274**: G544-551.
- Maity, S., A. Ukil, S. Karmakar, *et al.* (2003). "Thearubigin, the major polyphenol of black tea, ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis." Eur J Pharmacol **470**: 103-112.
- Manach, C., C. Morand, V. Crespy, *et al.* (1998). "Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties." FEBS Lett **426**: 331-336.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, *et al.* (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**: 727-747.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Remezy, *et al.* (2006). "Consommation et biodisponibilité des polyphénols." Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier: p 361-390.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, *et al.* (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr **81**: 230S-242S.
- Marek, A., J. Brodzicki, A. Liberek, *et al.* (2002). "TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker?" Med Sci Monit **8**: RA145-151.
- Marquez, L., B.G. Perez-Nievas, I. Garate, *et al.* (2010). "Anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract in a model of colitis." World J Gastroenterol **16**: 4922-4931.
- Marrero, J.A., K.A. Matkowskyj, K. Yung, *et al.* (2000). "Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappa B and increases galanin-1 receptor expression." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**: G797-804.
- Martin, A.R., I. Villegas, C. La Casa, *et al.* (2004). "Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats." Biochem Pharmacol **67**: 1399-1410.
- Martin, A.R., I. Villegas, M. Sanchez-Hidalgo, *et al.* (2006). "The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model." Br J Pharmacol **147**: 873-885.
- Matsui, T., S. Ebuchi, M. Kobayashi, *et al.* (2002). "Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar *Ayamurasaki* can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action." J Agric Food Chem **50**: 7244-7248.
- Matsumoto, H., H. Inaba, M. Kishi, *et al.* (2001). "Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms." J Agric Food Chem **49**: 1546-1551.
- Matsumoto, N., F. Ishigaki, A. Ishigaki, *et al.* (1993). "Reduction of blood glucose levels by tea catechin." Biosci Biotechnol Biochem **57**: 525-527.
- Mauray, A., D. Milenkovic, C. Besson, *et al.* (2009). "Atheroprotective effects of bilberry extracts in apo E-deficient mice." J Agric Food Chem **57**: 11106-11111.

- Mayer, A.M. and E. Harel (1979). "Polyphenol oxidases in plants." Phytochemistry **18**: 193-215.
- Mayer, L. and D. Eisenhardt (1990). "Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease." J Clin Invest **86**: 1255-1260.
- Mazza, G. and E. Miniati (1993). "Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains." Boca Raton. CRC press. 362 p
- Mazzon, E., E. Esposito, R. Di Paola, *et al.* (2009). "Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **380**: 79-94.
- Melgar, S., A. Karlsson and E. Michaelsson (2005). "Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation." Am J Physiol **288**: G1328-1338.
- Mennen, L.I., D. Sapinho, A. de Bree, *et al.* (2004). "Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women." J Nutr **134**: 923-926.
- Mercier, S., D. Breuille, L. Mosoni, *et al.* (2002). "Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats." J Nutr **132**: 1921-1928.
- Miller, M.J., J.H. Thompson, X.J. Zhang, *et al.* (1995). "Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis." Gastroenterology **109**: 1475-1483.
- Miura, Y., T. Chiba, I. Tomita, *et al.* (2001). "Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice." J Nutr **131**: 27-32.
- Miyazawa, T., K. Nakagawa, M. Kudo, *et al.* (1999). "Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans." J Agric Food Chem **47**: 1083-1091.
- Mochizuki, M. and N. Hasegawa (2005). "Protective effect of (-)-epigallocatechin gallate on acute experimental colitis." J H Sci **51**: 362-364.
- Moridani, M.Y., H. Scobie and P.J. O'Brien (2002). "Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions." Toxicol Lett **133**: 141-151.
- Morley, J.J. and I. Kushner (1982). "Serum C-reactive protein levels in disease." Ann N Y Acad Sci **389**: 406-418.
- Moser, B., M. Wolf, A. Walz, *et al.* (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol **25**: 75-84.
- Moshage, H. (1997). "Cytokines and the hepatic acute phase response." J Pathol **181**: 257-266.
- Mukamal, K.J., M. Maclure, J.E. Muller, *et al.* (2002). "Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction." Circulation **105**: 2476-2481.
- Mulder, T.P., H.W. Verspaget, A.R. Janssens, *et al.* (1991). "Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease." Gut **32**: 1146-1150.
- Mulier, B., I. Rahman, T. Watchorn, *et al.* (1998). "Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH)." Eur Respir J **11**: 384-391.
- Murakami, A., M. Song, S. Katsumata, *et al.* (2007). "Citrus nobiletin suppresses bone loss in ovariectomized ddY mice and collagen-induced arthritis in DBA/1J mice: possible involvement of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis regulation." Biofactors **30**: 179-192.
- Murphy, M.P., M.A. Packer, J.L. Scarlett, *et al.* (1998). "Peroxynitrite: a biologically significant oxidant." Gen Pharmacol **31**: 179-186.

- Mustafa, A., A. El-Medany, H.H. Hagar, *et al.* (2006). "*Ginkgo biloba* attenuates mucosal damage in a rat model of ulcerative colitis." Pharmacol Res **53**: 324-330.
- Nakagawa, K., M. Ninomiya, T. Okubo, *et al.* (1999). "Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans." J Agric Food Chem **47**: 3967-3973.
- Nakhai, L.A., A. Mohammadirad, N. Yasa, *et al.* (2007). "Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease." Evid Based Complement Alternat Med **4**: 43-50.
- Nam, S.Y., J.S. Kim, J.M. Kim, *et al.* (2008). "DA-6034, a derivative of flavonoid, prevents and ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis and inhibits colon carcinogenesis." Exp Biol Med **233**: 180-191.
- Nantz, M.P., C.A. Rowe, C. Nieves, Jr., *et al.* (2006). "Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate." J Nutr **136**: 2606-2610.
- Naugler, W.E. and M. Karin (2008). "NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms." Curr Opin Genet Dev **18**: 19-26.
- Neuman, M.G. (2007). "Immune dysfunction in inflammatory bowel disease." Transl Res **149**: 173-186.
- Neurath, M., I. Fuss and W. Strober (2000). "TNBS-colitis." Int Rev Immunol **19**: 51-62.
- Neurath, M.F., I. Fuss, M. Pasparakis, *et al.* (1997). "Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice." Eur J Immunol **27**: 1743-1750.
- Neutra, M.R., A. Frey and J.P. Kraehenbuhl (1996). "Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization." Cell **86**: 345-348.
- Neveu, V., J. Perez-Jimenez, F. Vos, *et al.* (2010). "Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods." Database (Oxford) sous presse.
- Niess, J.H. (2008). "Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**: 5138-5148.
- Niessner, M. and B.A. Volk (1995). "Phenotypic and immunoregulatory analysis of intestinal T-cells in patients with inflammatory bowel disease: evaluation of an in vitro model." Eur J Clin Invest **25**: 155-164.
- Oh, P.S. and K.T. Lim (2006). "Plant originated glycoprotein has anti-oxidative and anti-inflammatory effects on dextran sulfate sodium-induced colitis in mouse." J Biomed Sci **13**: 549-560.
- Okayama, M., S. Hayashi, Y. Aoi, *et al.* (2007). "Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats." Dig Dis Sci **52**: 2095-2103.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, *et al.* (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**: 694-702.
- Okazaki, Y., Y. Han, M. Kayahara, *et al.* (2010). "Consumption of curcumin elevates fecal immunoglobulin A, an index of intestinal immune function, in rats fed a high-fat diet." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **56**: 68-71.
- O'Leary, K.A., A.J. Day, P.W. Needs, *et al.* (2003). "Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism." Biochem Pharmacol **65**: 479-491.
- Oshitani, N., A. Kitano, H. Okabe, *et al.* (1993). "Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy." Gut **34**: 936-938.

- Osman, H.E., N. Maalej, D. Shanmuganayagam, *et al.* (1998). "Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys." *J Nutr* **128**: 2307-2312.
- Oz, H.S., T.S. Chen, C.J. McClain, *et al.* (2005). "Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis." *J Nutr Biochem* **16**: 297-304.
- Papadakis, K.A. and S.R. Targan (2000). "Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Annu Rev Med* **51**: 289-298.
- Papanicolaou, D.A., R.L. Wilder, S.C. Manolagas, *et al.* (1998). "The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease." *Ann Intern Med* **128**: 127-137.
- Paradkar, P.N., P.S. Blum, M.A. Berhow, *et al.* (2004). "Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine." *Cancer Lett* **215**: 21-28.
- Pascual, M.E., K. Slowing, E. Carretero, *et al.* (2001). "Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." *J Ethnopharmacol* **76**: 201-214.
- Patel, M. and P. Patel (2010). "Aqueous extract of *Ficus bengalensis* linn. bark for inflammatory bowel disease." *J Young Pharm* **2**: 130-136.
- Pelissier, M.A., C. Muller, M. Hill, *et al.* (2006). "Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat." *Steroids* **71**: 240-248.
- Perez-Jimenez, J., L. Fezeu, M. Touvier, *et al.* (2011). "Dietary intake of 337 polyphenols in french adults." *Am J Clin Nutr* **sous presse**.
- Perrot, E. and R. Paris (1974). "Les plantes médicinales." Presses universitaires de France. 244 p
- Peters, U., C. Poole and L. Arab (2001). "Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis." *Am J Epidemiol* **154**: 495-503.
- Pharmacopée, F. (2007). "Liste des plantes médicinales." AFSSAPS. 92 p
- Piskula, M.K. and J. Terao (1998). "Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues." *J Nutr* **128**: 1172-1178.
- Pitocco, D., F. Zaccardi, E. Di Stasio, *et al.* (2010). "Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes." *Rev Diabet Stud* **7**: 15-25.
- Pocock, G. and C.D. Richards (2004). "Intestin et nutrition." *Physiologie humaine, les fondements de la médecine*. Paris: p 399-444.
- Porath, D., C. Riegger, J. Drewe, *et al.* (2005). "Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines." *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 1172-1180.
- Price, S.F., P.J. Breen, M. Valladao, *et al.* (1995). "Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine." *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 187-194.
- Puel, C., J. Mardon, A. Agalias, *et al.* (2008). "Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model." *J Agric Food Chem* **56**: 9417-9422.
- Quirantes-Pine, R., L. Funes, V. Micol, *et al.* (2009). "High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract." *J Chromatogr A* **1216**: 5391-5397.
- Rachmilewitz, D., F. Karmeli, E. Okon, *et al.* (1995). "Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity." *Gut* **37**: 247-255.
- Rahman, F.Z., D.J. Marks, B.H. Hayee, *et al.* (2008). "Phagocyte dysfunction and inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **14**: 1443-1452.
- Rahman, I., S.K. Biswas and P.A. Kirkham (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." *Biochem Pharmacol* **72**: 1439-1452.

- Ramiro-Puig, E., F.J. Perez-Cano, C. Castellote, *et al.* (2008). "The bowel: a key component of the immune system." *Rev Esp Enferm Dig* **100**: 29-34.
- Rao, C.V. (2004). "Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention." *Mutat Res* **555**: 107-119.
- Rath, H.C., J.S. Ikeda, H.J. Linde, *et al.* (1999). "Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats." *Gastroenterology* **116**: 310-319.
- Rechner, A.R., G. Kuhnle, P. Bremner, *et al.* (2002). "The metabolic fate of dietary polyphenols in humans." *Free Radic Biol Med* **33**: 220-235.
- Rechner, A.R., J.P. Spencer, G. Kuhnle, *et al.* (2001). "Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo." *Free Radic Biol Med* **30**: 1213-1222.
- Reeves, M.A. and P.R. Hoffmann (2009). "The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation." *Cell Mol Life Sci* **66**: 2457-2478.
- Rein, D., S. Lotito, R.R. Holt, *et al.* (2000a). "Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status." *J Nutr* **130**: 2109S-2114S.
- Rein, D., T.G. Paglieroni, T. Wun, *et al.* (2000b). "Cocoa inhibits platelet activation and function." *Am J Clin Nutr* **72**: 30-35.
- Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." *Lancet* **339**: 1523-1526.
- Rendeiro, C., J.P. Spencer, D. Vauzour, *et al.* (2009). "The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms." *Genes Nutr*.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, *et al.* (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat Immunol* **2**: 361-367.
- Rezaie, A., R. Parker and M. Abdollahi (2007). "Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?" *Dig Dis Sci* **52**: 2015-2021.
- Rice-Evans, C. and N.J. Miller (1994). "Total antioxidant status in plasma and body fluids." *Methods Enzymol* **234**: 279-293.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, *et al.* (1995). "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids." *Free Radic Res* **22**: 375-383.
- Ricketts, C.R. (1952). "Dextran sulphate-a synthetic analogue of heparin." *Biochem J* **51**: 129-133.
- Rivera-Nieves, J.s., G. Bamias, A. Vidrich, *et al.* (2003). "Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis." *Gastroenterology* **124**: 972-982.
- Roessner, A., D. Kuester, P. Malfertheiner, *et al.* (2008). "Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis." *Pathol Res Pract* **204**: 511-524.
- Rogler, G. and T. Andus (1998a). "Cytokines in inflammatory bowel disease." *World J Surg* **22**: 382-389.
- Rogler, G., K. Brand, D. Vogl, *et al.* (1998b). "Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa." *Gastroenterology* **115**: 357-369.
- Roitt, I., J. Brostoff and D. Male (2002). "*Immunologie*." d. B. Université Bruxelles. de Boeck Université. 480 p
- Rojas-Cartagena, C., I. Flores and C.B. Appleyard (2005). "Role of tumor necrosis factor receptors in an animal model of acute colitis." *Cytokine* **32**: 85-93.

- Romero-Perez, A.I., R.M. Lamuela-Raventos, A.L. Waterhouse, *et al.* (1996). "Levels of cis- and trans-resveratrol and their glucosides in white and rose vitis vinifera wines from Spain." J Agric Food Chem **44**: 2124-2128.
- Romier, B., Y.J. Schneider, Y. Larondelle, *et al.* (2009). "Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response." Nutr Rev **67**: 363-378.
- Romier, B., J. Van De Walle, A. During, *et al.* (2008). "Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells." Br J Nutr **100**: 542-551.
- Romier-Crouzet, B., J. Van De Walle, A. During, *et al.* (2009). "Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells." Food Chem Toxicol **47**: 1221-1230.
- Rossi, M., E. Negri, R. Talamini, *et al.* (2006). "Flavonoids and colorectal cancer in Italy." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**: 1555-1558.
- Roussel, A.M., J. Nève and I. Hininger (2005). "Antioxydants et nutrition." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: p 261-280.
- Russo, P., I. Tedesco, M. Russo, *et al.* (2001). "Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**: 25-29.
- Sadakane, C., J. Koseki, Y. Inagaki, *et al.* (2010). "TJN-419 improves dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibition of interleukin-12 release." Biol Pharm Bull **33**: 84-90.
- Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, *et al.* (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**: 253-261.
- Sagesaka-Mitane, Y., M. Miwa and S. Okada (1990). "Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea." Chem Pharm Bull (Tokyo) **38**: 790-793.
- Salas-Salvado, J., J. Fernandez-Ballart, E. Ros, *et al.* (2008). "Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial." Arch Intern Med **168**: 2449-2458.
- Sanchez de Medina, F., B. Vera, J. Galvez, *et al.* (2002). "Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat." Life Sci **70**: 3097-3108.
- Sanchez-Fidalgo, S., A. Cardeno, I. Villegas, *et al.* (2010). "Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice." Eur J Pharmacol **633**: 78-84.
- Sanchez-Munoz, F., A. Dominguez-Lopez and J.K. Yamamoto-Furusho (2008). "Role of cytokines in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**: 4280-4288.
- Santangelo, C., R. Vari, B. Scazzocchio, *et al.* (2007). "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." Ann Ist Super Sanita **43**: 394-405.
- Santos-Buelga, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds : nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." J Sci Food Agric **80**: 1094-1117.
- Satoh, H., F. Sato, K. Takami, *et al.* (1997). "New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis." Jpn J Pharmacol **73**: 299-309.
- Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, *et al.* (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **45**: 287-306.
- Scalbert, A., C. Morand, C. Manach, *et al.* (2002). "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health." Biomed Pharmacother **56**: 276-282.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J Nutr **130**: 2073S-2085S.
- Scheline, A. and P. Keller (1991). "Handbook of mammalian metabolism of plant compounds." Boca Raton. CRC Press. 665 p

- Schindler, R. and R. Mentlein (2006). "Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells." *J Nutr* **136**: 1477-1482.
- Schreiber, S., T. Heinig, H.G. Thiele, *et al.* (1995). "Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **108**: 1434-1444.
- Segal, A.W. (2005). "How neutrophils kill microbes." *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.
- Segui, J., M. Gironella, M. Sans, *et al.* (2004). "Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine." *J Leukoc Biol* **76**: 537-544.
- Selby, W.S., G. Janossy, D.Y. Mason, *et al.* (1983). "Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease." *Clin Exp Immunol* **53**: 614-618.
- Serafini, M., A. Ghiselli and A. Ferro-Luzzi (1996). "In vivo antioxidant effect of green and black tea in man." *Eur J Clin Nutr* **50**: 28-32.
- Serafini, M., G. Maiani and A. Ferro-Luzzi (1998). "Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans." *J Nutr* **128**: 1003-1007.
- Seril, D.N., J. Liao and G.Y. Yang (2007). "Colorectal carcinoma development in inducible nitric oxide synthase-deficient mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis." *Mol Carcinog* **46**: 341-353.
- Seril, D.N., J. Liao, G.Y. Yang, *et al.* (2003). "Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models." *Carcinogenesis* **24**: 353-362.
- Serteyn, D., S. Grulke, T. Franck, *et al.* (2003). "La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes." *Ann méd vét* **147**: 79-93.
- Seruga, B., H. Zhang, L.J. Bernstein, *et al.* (2008). "Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer." *Nat Rev Cancer* **8**: 887-899.
- Sesink, A.L., I.C. Arts, M. Faassen-Peters, *et al.* (2003). "Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase." *J Nutr* **133**: 773-776.
- Sfakianos, J., L. Coward, M. Kirk, *et al.* (1997). "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." *J Nutr* **127**: 1260-1268.
- Shahidi, F. and M. Nacz (1995). "Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications." Lancaster. Technomic Publishing Co Inc. 330 p
- Shahidi, F. and M. Nacz (2003). "Antioxidant properties of food phenolics." *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, CRC Press: p 403-442.
- Shapiro, H., P. Singer, Z. Halpern, *et al.* (2007). "Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis." *Gut* **56**: 426-435.
- Sharma, V. and L.J. Rao (2009). "A thought on the biological activities of black tea." *Crit Rev Food Sci Nutr* **49**: 379-404.
- Sharpe, P.C., L.T. McGrath, E. McClean, *et al.* (1995). "Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis." *QJM* **88**: 101-108.
- Sheibanie, A.F., J.H. Yen, T. Khayrullina, *et al.* (2007). "The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis." *J Immunol* **178**: 8138-8147.
- Shi, X.Z., J.H. Winston and S.K. Sarna (2011). "Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**: G41-51.
- Shimizu, T., M. Suzuki, J. Fujimura, *et al.* (2003). "The relationship between the concentration of dextran sodium sulfate and the degree of induced experimental colitis in weanling rats." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **37**: 481-486.

- Shimoi, K., H. Okada, M. Furugori, *et al.* (1998). "Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-[beta]-glucoside in rats and humans." *FEBS Lett* **438**: 220-224.
- Shintani, N., T. Nakajima, T. Okamoto, *et al.* (1998). "Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action." *Gen Pharmacol* **31**: 477-481.
- Shisheva, A. and Y. Shechter (1992). "Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes." *Biochemistry* **31**: 8059-8063.
- Simic, M.G. and S.V. Jovanovic (1989). "Antioxidation mechanisms of uric acid." *J Am Chem Soc* **111**: 5778-5782.
- Simmonds, N.J., R.E. Allen, T.R. Stevens, *et al.* (1992). "Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **103**: 186-196.
- Singer, II, D.W. Kawka, S. Schloemann, *et al.* (1998). "Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **115**: 297-306.
- Singer, II, D.W. Kawka, S. Scott, *et al.* (1996). "Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **111**: 871-885.
- Singh, K., A.S. Jaggi and N. Singh (2009). "Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice." *Phytother Res* **23**: 1565-1574.
- Singh, U.P., N.P. Singh, B. Singh, *et al.* (2010). "Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis." *J Pharmacol Exp Ther* **332**: 829-839.
- Solomon, L., S. Mansor, P. Mallon, *et al.* (2010). "The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview." *Comp Clin Pathol* **19**: 235-239.
- Soyalan, B., J. Minn, H.J. Schmitz, *et al.* (2011). "Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver." *Eur J Nutr* **50**: 135-143.
- Spencer, J.P. (2008a). "Flavonoids: modulators of brain function?" *Br J Nutr* **99**: ES60-77.
- Spencer, J.P. (2008b). "Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance." *Proc Nutr Soc* **67**: 238-252.
- Spencer, J.P. (2010). "The impact of fruit flavonoids on memory and cognition." *Br J Nutr* **104**: S40-47.
- Spencer, J.P., G. Chowrimootoo, R. Choudhury, *et al.* (1999). "The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids." *FEBS Lett* **458**: 224-230.
- Stefani, E.D., P. Boffetta, H. Deneo-Pellegrini, *et al.* (1999). "Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay." *Nutr Cancer* **34**: 100-110.
- Steghens, J.P., F. Flourie, K. Arab, *et al.* (2003). "Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **798**: 343-349.
- Steghens, J.P., A.L. van Kappel, I. Denis, *et al.* (2001). "Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum." *Free Radic Biol Med* **31**: 242-249.
- Steinhoff, U., V. Brinkmann, U. Klemm, *et al.* (1999). "Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells." *Immunity* **11**: 349-358.
- Stevenson, D.E. and R.D. Hurst (2007). "Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?" *Cell Mol Life Sci* **64**: 2900-2916.

- Strober, W. (1985). "Animal models of inflammatory bowel disease-an overview." Dig Dis Sci **30**: 3S-10S.
- Sturniolo, G.C., C. Mestriner, P.E. Lecis, *et al.* (1998). "Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis." Scand J Gastroenterol **33**: 644-649.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, *et al.* (1995). "Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane." Cancer Lett **91**: 139-144.
- Takedatsu, H., K.S. Michelsen, B. Wei, *et al.* (2008). "TL1A (TNFSF15) Regulates the Development of Chronic Colitis by Modulating Both T-Helper 1 and T-Helper 17 Activation." Gastroenterology **135**: 552-567.e552.
- Tebib, K., P. Besancon and J.M. Rouanet (1994). "Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets." J Nutr **124**: 2451-2457.
- Tedeschi, E., M. Menegazzi, Y. Yao, *et al.* (2004). "Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha activation." Mol Pharmacol **65**: 111-120.
- Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin, *et al.* (2010). "Inflammation and colon cancer." Gastroenterology **138**: 2101-2114.
- Thérond, P. and D. Blache (2005a). "Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote - Effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: p 113-146.
- Thérond, P. and D. Bonnefont-Rousselot (2005b). "Systèmes antioxydants endogènes." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: p 87-111.
- Thomas, G.A., G.L. Swift, J.T. Green, *et al.* (1998). "Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study." Gut **42**: 497-500.
- Thompson, L.U., P. Robb, M. Serraino, *et al.* (1991). "Mammalian lignan production from various foods." Nutr Cancer **16**: 43-52.
- Tilgmann, C. and I. Ulmanen (1996). "Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases." J Chromatogr B Biomed Appl **684**: 147-161.
- Tillett, W.S. and T. Francis (1930). "Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of *Pneumococcus*." J Exp Med **52**: 561-571.
- Tomas-Barberan, F.A. and M.N. Clifford (2000a). "Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden." J Sci Food Agric **80**: 1024-1032.
- Tomas-Barberan, F.A. and M.N. Clifford (2000b). "Flavanones, chalcones and dihydrochalcones : nature, occurrence and dietary burden." J Sci Food Agric **80**: 1073-1080.
- Trivedi, R., S. Kumar, A. Kumar, *et al.* (2008). "Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats." Mol Cell Endocrinol **289**: 85-93.
- Tsuchida, K., S. Mizushima, M. Toba, *et al.* (1999). "Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in Yokohama." J Epidemiol **9**: 14-19.
- Ueda, H., C. Yamazaki and M. Yamazaki (2003). "Inhibitory effect of Perilla leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion." Biol Pharm Bull **26**: 560-563.
- Ukil, A., S. Maity and P.K. Das (2006). "Protection from experimental colitis by theaflavin-3,3'-digallate correlates with inhibition of IKK and NF-kappaB activation." Br J Pharmacol **149**: 121-131.
- Umesalma, S. and G. Sudhandiran (2010). "Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis." Basic Clin Pharmacol Toxicol **107**: 650-655.

- Unno, T., K. Kondo, H. Itakura, *et al.* (1996). "Analysis of (-)-epigallocatechin gallate in human serum obtained after ingesting green tea." Biosci Biotechnol Biochem **60**: 2066-2068.
- Uno, K. and S.J. Nicholls (2010). "Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis." Biomark Med **4**: 361-373.
- Urban, D., W. Irwin, M. Kirk, *et al.* (2001). "The effect of isolated soy protein on plasma biomarkers in elderly men with elevated serum prostate specific antigen." J Urol **165**: 294-300.
- Valentao, P., E. Fernandes, F. Carvalho, *et al.* (2002). "Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid." Biol Pharm Bull **25**: 1324-1327.
- Valko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, *et al.* (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**: 1-40.
- Van Crombruggen, K., L. Van Nassauw, P. Demetter, *et al.* (2008). "Influence of soluble guanylate cyclase inhibition on inflammation and motility disturbances in DSS-induced colitis." Eur J Pharmacol **579**: 337-349.
- van Dam, R.M. and E.J. Feskens (2002). "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus." Lancet **360**: 1477-1478.
- van der Woude, C.J., J.H. Kleibeuker, P.L. Jansen, *et al.* (2004). "Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract." Apoptosis **9**: 123-130.
- Van Kemseke, C., J. Belaiche and E. Louis (2000). "Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission." Int J Colorectal Dis **15**: 206-210.
- van Miert, A.S. (1995). "Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects." Vet Q **17**: 41-50.
- Vauzour, D., G. Ravaoli, K. Vafeiadou, *et al.* (2008). "Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHT-1: implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols." Arch Biochem Biophys **476**: 145-151.
- Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Gao, *et al.* (1998). "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products." J Agric Food Chem **46**: 4113-4117.
- Verstraeten, S.V., C.L. Keen, H.H. Schmitz, *et al.* (2003). "Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure." Free Radic Biol Med **34**: 84-92.
- Vetuschi, A., G. Latella, R. Sferra, *et al.* (2002). "Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats." Dig Dis Sci **47**: 1447-1457.
- Vicario, M., C. Amat, M. Rivero, *et al.* (2007). "Dietary glutamine affects mucosal functions in rats with mild DSS-induced colitis." J Nutr **137**: 1931-1937.
- Vicario, M., M. Crespi, A. Franch, *et al.* (2005). "Induction of colitis in young rats by dextran sulfate sodium." Dig Dis Sci **50**: 143-150.
- Vijayababu, M.R., A. Arunkumar, P. Kanagaraj, *et al.* (2006). "Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3)." Mol Cell Biochem **287**: 109-116.
- Villegas, I., S. Sanchez-Fidalgo and C.A. de la Lastra (2011). "Chemopreventive effect of dietary curcumin on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice." Mol Nutr Food Res **55**: 259-267.
- von Lampe, B., B. Barthel, S.E. Coupland, *et al.* (2000). "Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease." Gut **47**: 63-73.

- Vowinkel, T., T.J. Kalogeris, M. Mori, *et al.* (2004). "Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis." Dig Dis Sci **49**: 556-564.
- Walle, U.K., A. Galijatovic and T. Walle (1999). "Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2." Biochem Pharmacol **58**: 431-438.
- Wang, D. and R.N. DuBois (2008). "Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer." Cancer Lett **267**: 197-203.
- Wang, J.F., D.D. Schramm, R.R. Holt, *et al.* (2000). "A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage." J Nutr **130**: 2115S-2119S.
- Wang, S., Z. Liu, L. Wang, *et al.* (2009). "NF-[kappa]B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer." Cell Mol Immunol **6**: 327-334.
- Wardman, P. and L.P. Candeias (1996). "Fenton Chemistry: An Introduction." Radiat Res **145**: 523-531.
- Watanabe, S., M. Yamaguchi, T. Sobue, *et al.* (1998). "Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)." J Nutr **128**: 1710-1715.
- Whiteman, M., U. Ketsawatsakul and B. Halliwell (2002). "A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid." Ann N Y Acad Sci **962**: 242-259.
- Wirtz, S., S. Finotto, S. Kanzler, *et al.* (1999). "Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF-plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens." J Immunol **162**: 1884-1888.
- Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann, *et al.* (2007a). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**: 541-546.
- Wirtz, S. and M.F. Neurath (2007b). "Mouse models of inflammatory bowel disease." Adv Drug Deliv Rev **59**: 1073-1083.
- Wittig, B. Wittig, Zeitz, *et al.* (2003). "The gut as an organ of immunology." Int J Colorectal Dis **18**: 181-187.
- Wollny, T., L. Aiello, D. Di Tommaso, *et al.* (1999). "Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production." Br J Pharmacol **127**: 747-755.
- Woof, J.M. and J. Mestecky (2005). "Mucosal immunoglobulins." Immunological Reviews **206**: 64-82.
- Wu, Y.T., L.C. Lin, J.S. Sung, *et al.* (2006). "Determination of acteoside in *Cistanche deserticola* and *Boschniakia rossica* and its pharmacokinetics in freely-moving rats using LC-MS/MS." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **844**: 89-95.
- Xu, L., Z.L. Yang, P. Li, *et al.* (2009). "Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium." Phytomedicine **16**: 989-995.
- Yamakoshi, J., S. Kataoka, T. Koga, *et al.* (1999). "Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **142**: 139-149.
- Yang, F., H.S. Oz, S. Barve, *et al.* (2001). "The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6." Mol Pharmacol **60**: 528-533.
- Yao, J., J.Y. Wang, L. Liu, *et al.* (2010). "Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis." Arch Med Res **41**: 288-294.
- Yomogida, S., Y. Kojima, Y. Tsutsumi-Ishii, *et al.* (2008). "Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats." Int J Mol Med **22**: 317-323.

- Young, J.F., L.O. Dragstedt, J. Haraldsdottir, *et al.* (2002). "Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet." Br J Nutr **87**: 343-355.
- Young, J.F., S.E. Nielsen, J. Haraldsdottir, *et al.* (1999). "Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status." Am J Clin Nutr **69**: 87-94.
- Zhao, W., L. Song and D. Hongzhu (2010). "Amelioration of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis by sulfasalazine salicylazosulfapyridine via reducing NF-kappaB transcription factor p65 recruitment to ICAM-1 gene promoters." Yakugaku Zasshi **130**: 1239-1249.
- Zhou, Y., H. Wang, L. Liang, *et al.* (2010). "Total alkaloids of *Sophora alopecuroides* increases the expression of CD4+ CD25+ Tregs and IL-10 in rats with experimental colitis." Am J Chin Med **38**: 265-277.
- Zhou, Y.H., J.P. Yu, Y.F. Liu, *et al.* (2006). "Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats." Mediators Inflamm **2006**: 92642.

FIGURES ET TABLEAUX

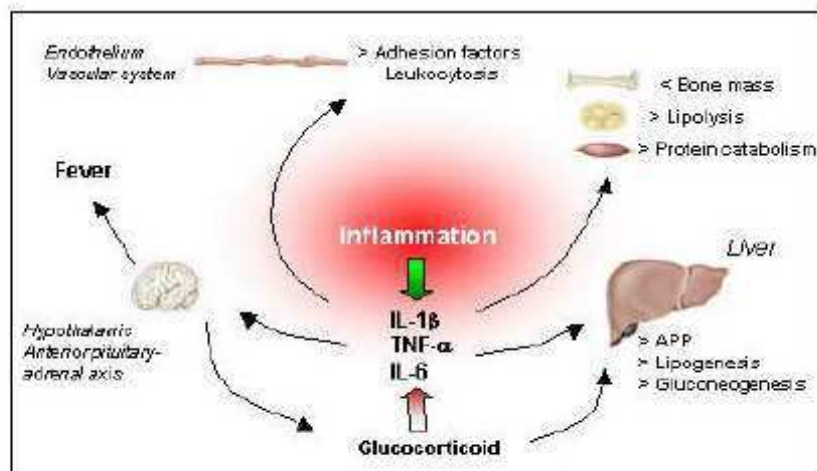


Figure 1. Réaction de la phase aiguë de l'inflammation (D'après Ceciliani et al. 2002). La flèche verte indique une activité promotrice tandis que la flèche rouge indique une activité inhibitrice. APP : Acute Phase Protein.

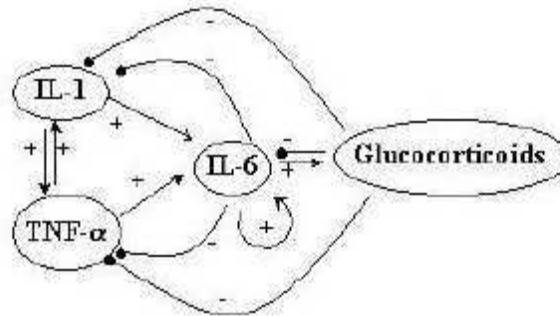


Figure 2. Régulation de la production de l'IL-6. (D'après Ceciliani et al. 2002). Le TNF- α est produit dans un premier temps, suivi de l'IL-1 β puis de l'IL-6. TNF- α et IL-1 β stimulent la production de l'IL-6 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur leurs expressions. De plus, l'IL-6 stimule sa propre production ainsi que celle des glucocorticoïdes qui exerceront également un rétrocontrôle négatif sur ces trois cytokines

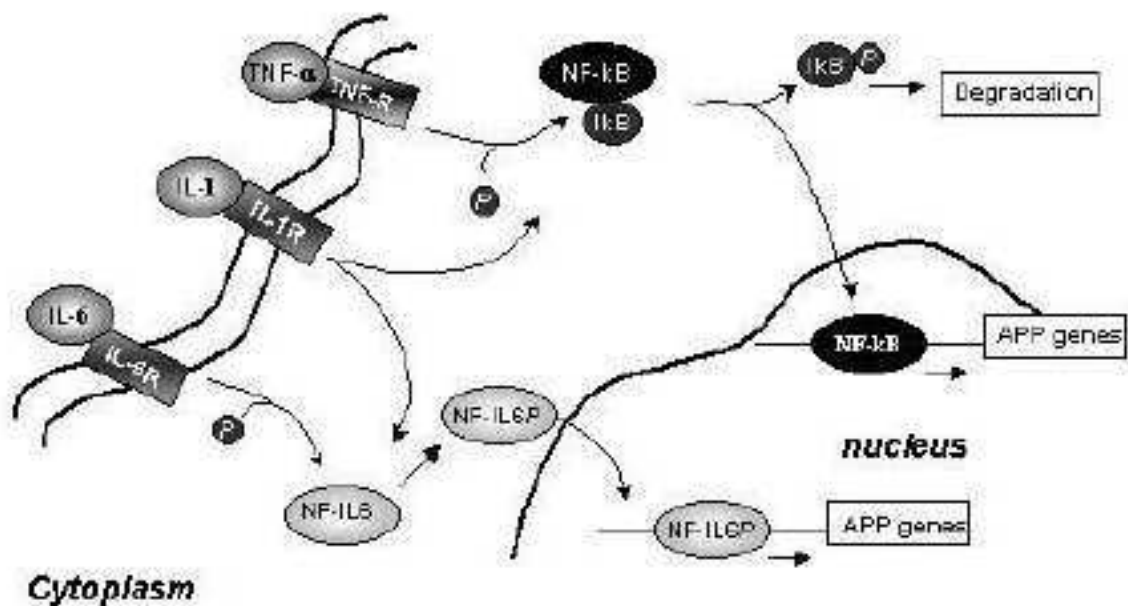


Figure 3. Activation des voies de signalisation par les cytokines pro-inflammatoires et production des protéines de la phase aiguë (D'après Ceciliani et al. 2002).

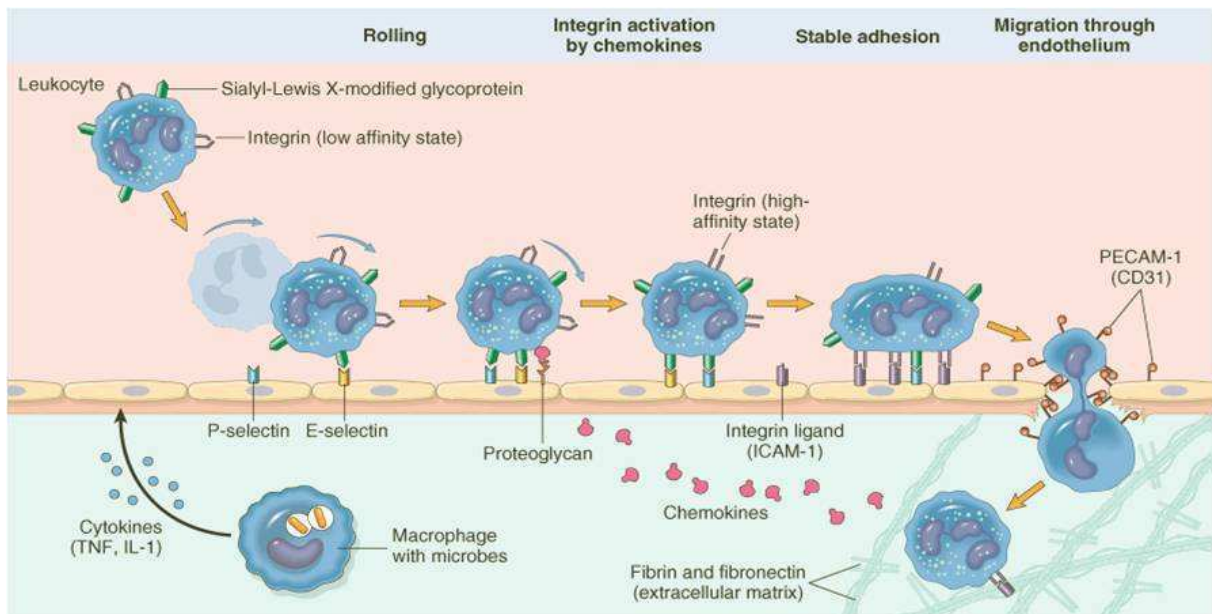


Figure 4. Margination des leucocytes. L'interaction entre l'E-sélectine et la P-sélectine en surface des cellules endothéliales avec les glycoprotéines en surface des leucocytes permet le ralentissement des cellules. Cette liaison est renforcée par l'interaction entre I-CAM en surface de l'endothélium et les intégrines des leucocytes.

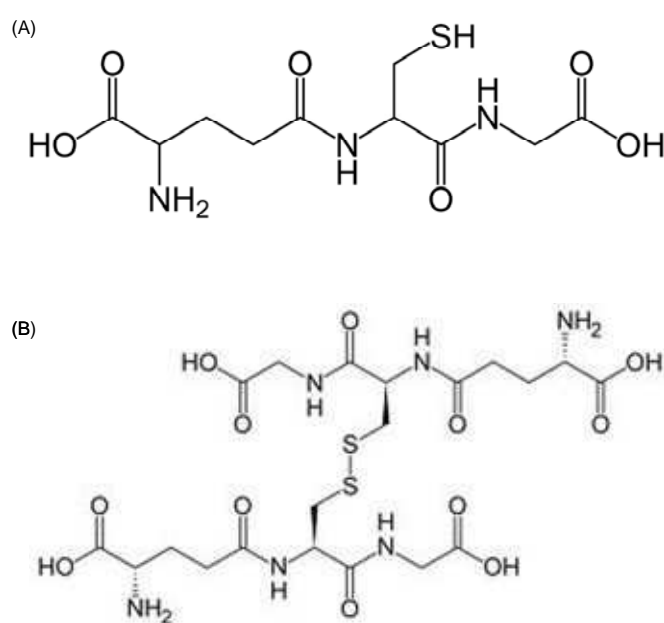
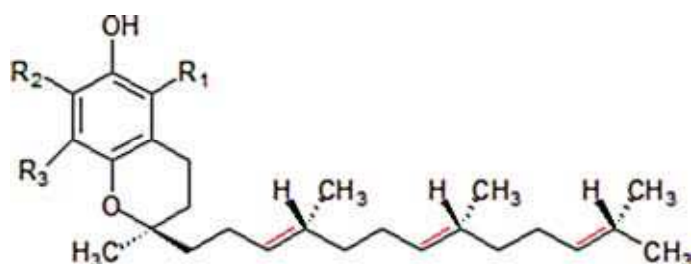


Figure 5. Structures du glutathion. (A) structure du glutathion réduit (GSH) ; (B) structure du glutathion oxydé dissulfure (GSSG).

(A)



(B)

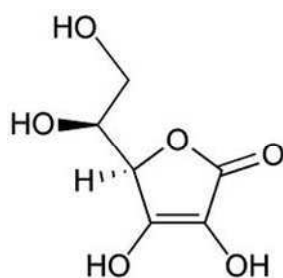
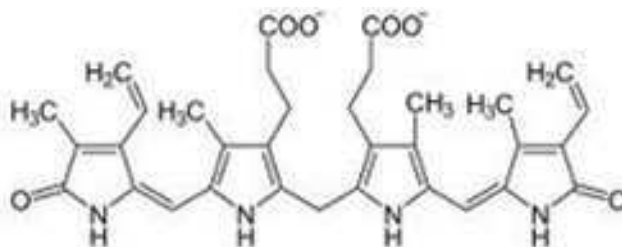
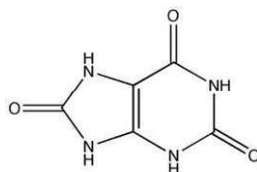


Figure 6. Structures des vitamines E et C. (A) structure de la vitamine E (α -tocophérol) ; (B) structure de la vitamine C (acide ascorbique).

(A)



(B)



(C)

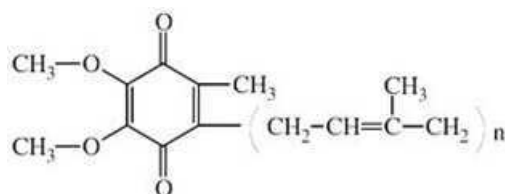


Figure 7. Structures de la bilirubine (A), de l'acide urique (B) et du coenzyme Q (C).

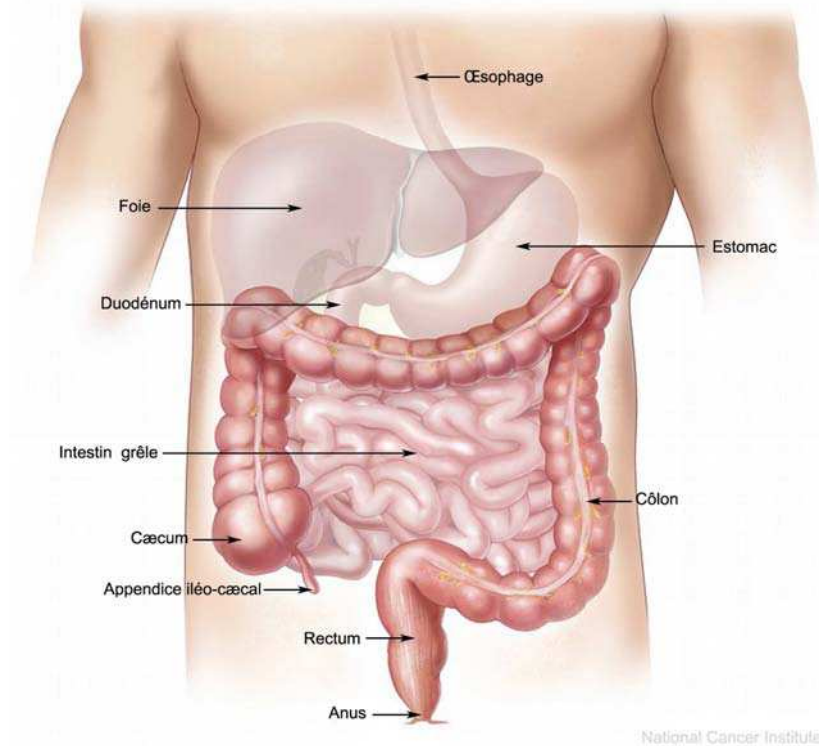


Figure 8. Vue détaillée de l'appareil digestif humain.
[en ligne] <http://www.science-et-vie.net/definition-colon-889.html>
consulté le 29/04/11

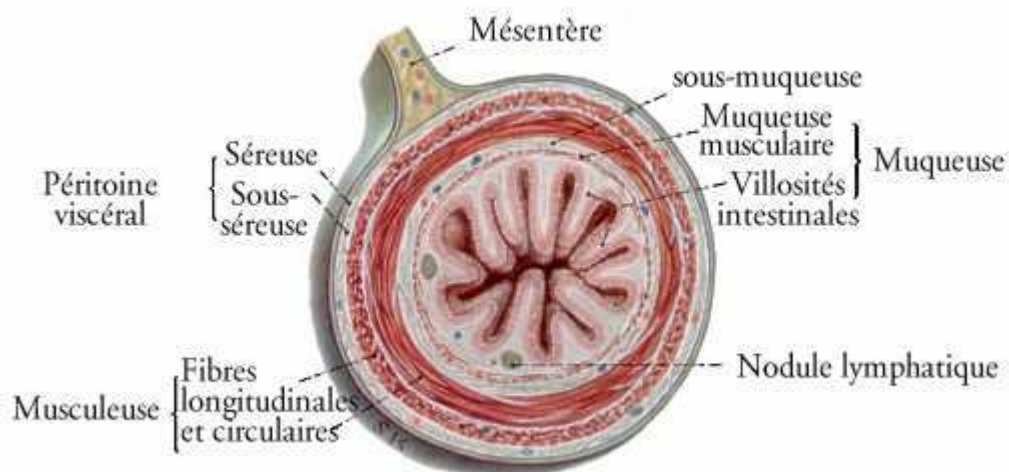


Figure 9. Côlon en coupe transversale [en ligne]
[http://www.corpshumain.ca/images/excret_intestin_coupe_\(FF\).jpg](http://www.corpshumain.ca/images/excret_intestin_coupe_(FF).jpg) consulté le
29/04/11

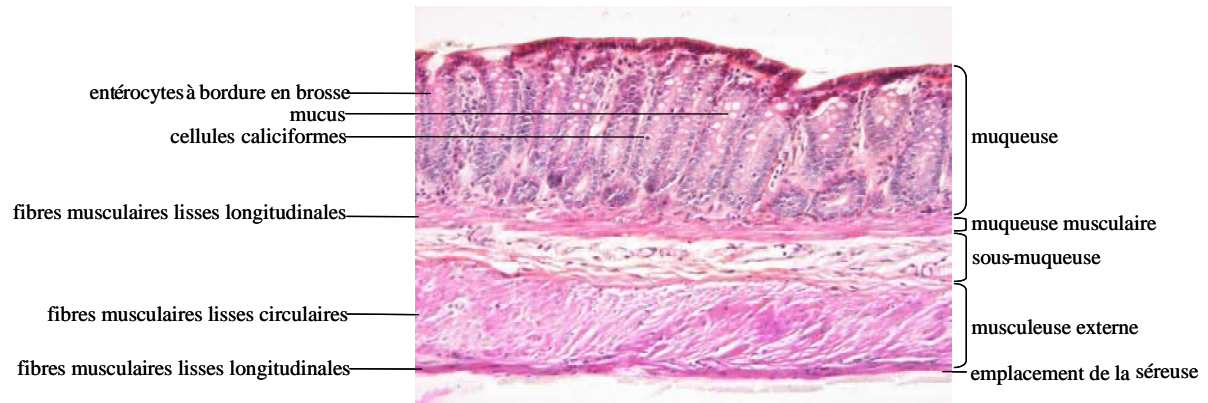


Figure 10. Coupe transversale de la paroi du côlon en microscopie optique. Coloration hématoxyline-phloxine-safran (HPS) ; grossissement x 10

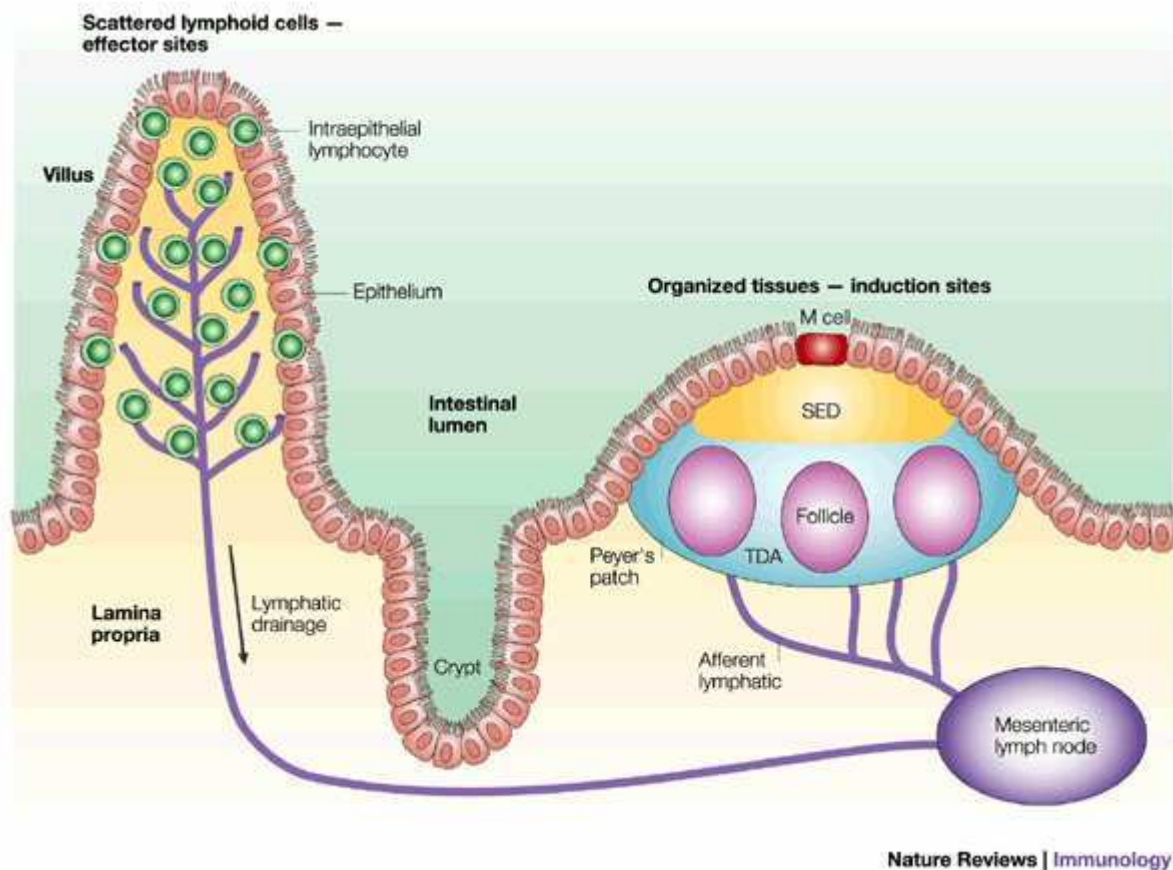


Figure 11. Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT) (D'après Mowat 2003). SED, dôme subépithélial ; TDA, aire thymus-dépendante.

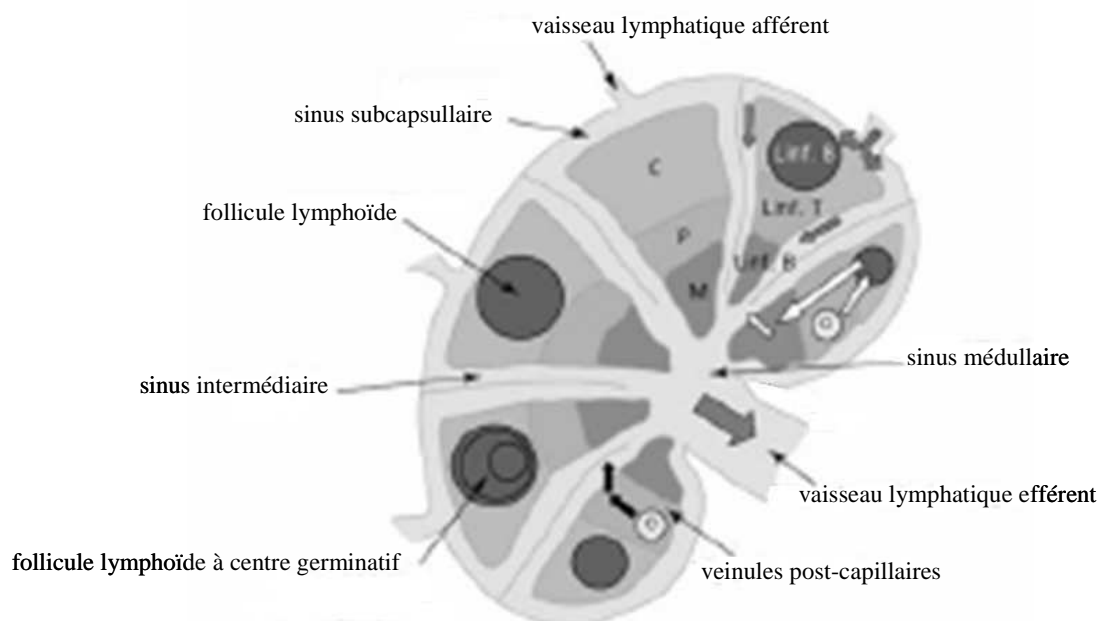


Figure 12. Représentation schématique de la structure des ganglions mésentériques (D'après Ramiro-Puig et al. 2008).

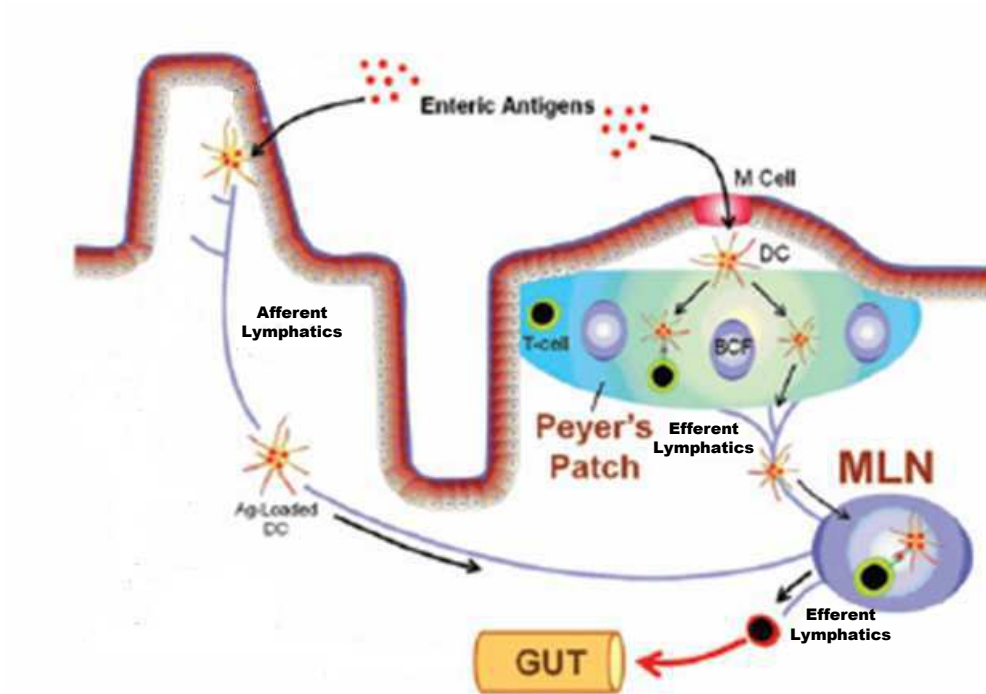


Figure 13. Réponse immunitaire intestinale (D'après Koboziev et al. 2010). Les antigènes pénètrent dans les plaques de Peyer via les cellules M puis sont endocytés par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques porteuses de l'antigène interagissent avec les cellules T présentes dans les plaques de Peyer ou migrent vers les ganglions mésentériques via les vaisseaux lymphatiques afférents. Les cellules T naïves présentes dans les ganglions mésentériques seront activées par ces cellules dendritiques pour devenir des cellules effectrices et quitter les ganglions via les vaisseaux lymphatiques efférents pour gagner la circulation sanguine et retourner ensuite dans la *lamina propria*. BCF, follicules de lymphocytes B ; DC, cellules dendritiques ; MLN, ganglions mésentériques.

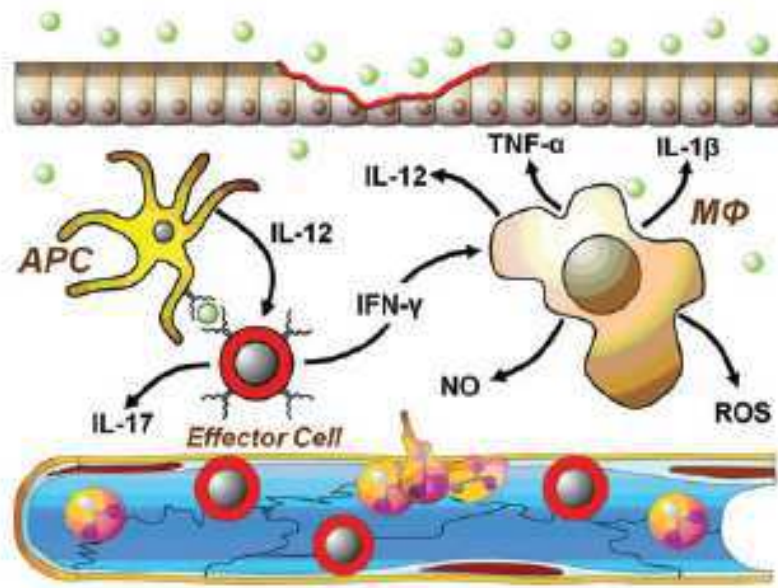


Figure 14. Interaction des lymphocytes activés avec les cellules présentatrices d'antigène initiant l'inflammation intestinale (D'après Koboziev et al. 2010). APC, cellules présentatrices d'antigène ; MΦ, macrophage.

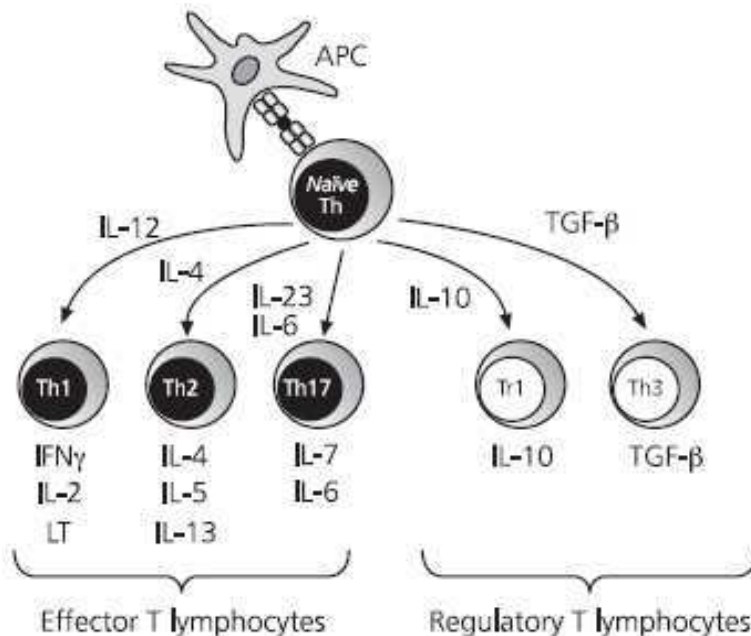


Figure 15. Classification des lymphocytes T helper activés. Les sous-populations cellulaires sont déterminées selon les cytokines sécrétées (D'après Ramiro-Puig et al. 2008).

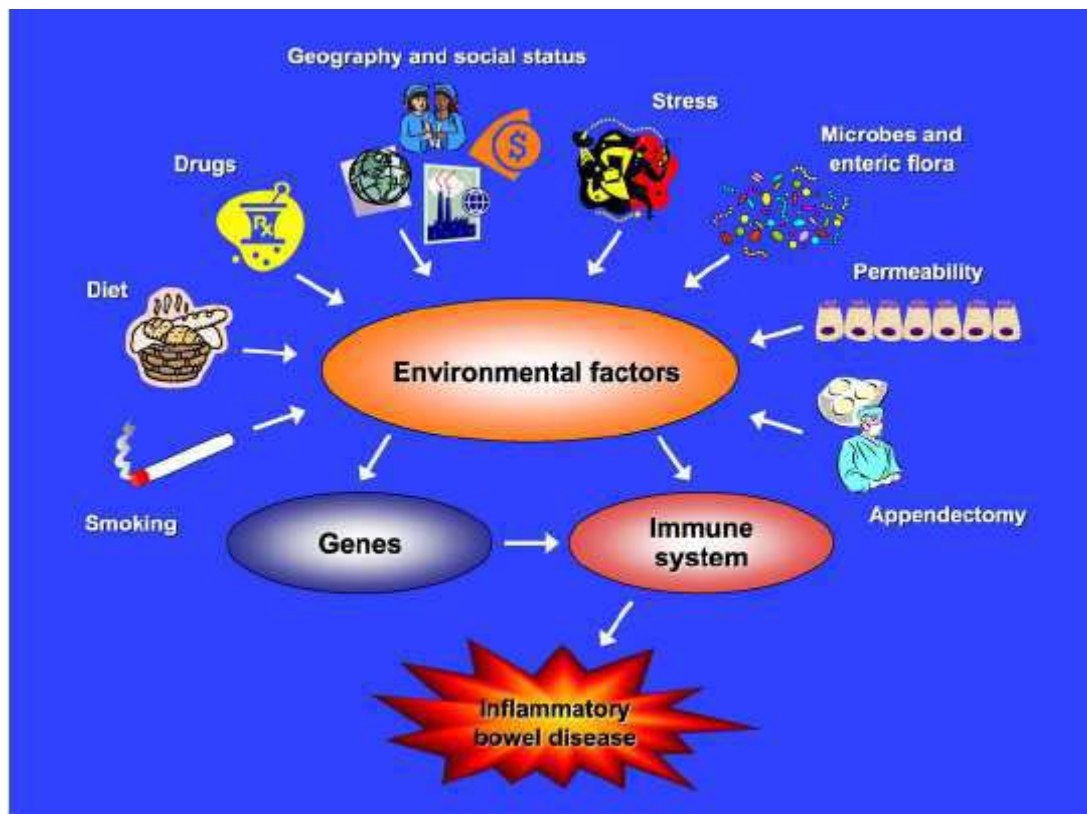


Figure 16. Impact des facteurs environnementaux sur le développement des MICI (D'après Danese et al. 2004).

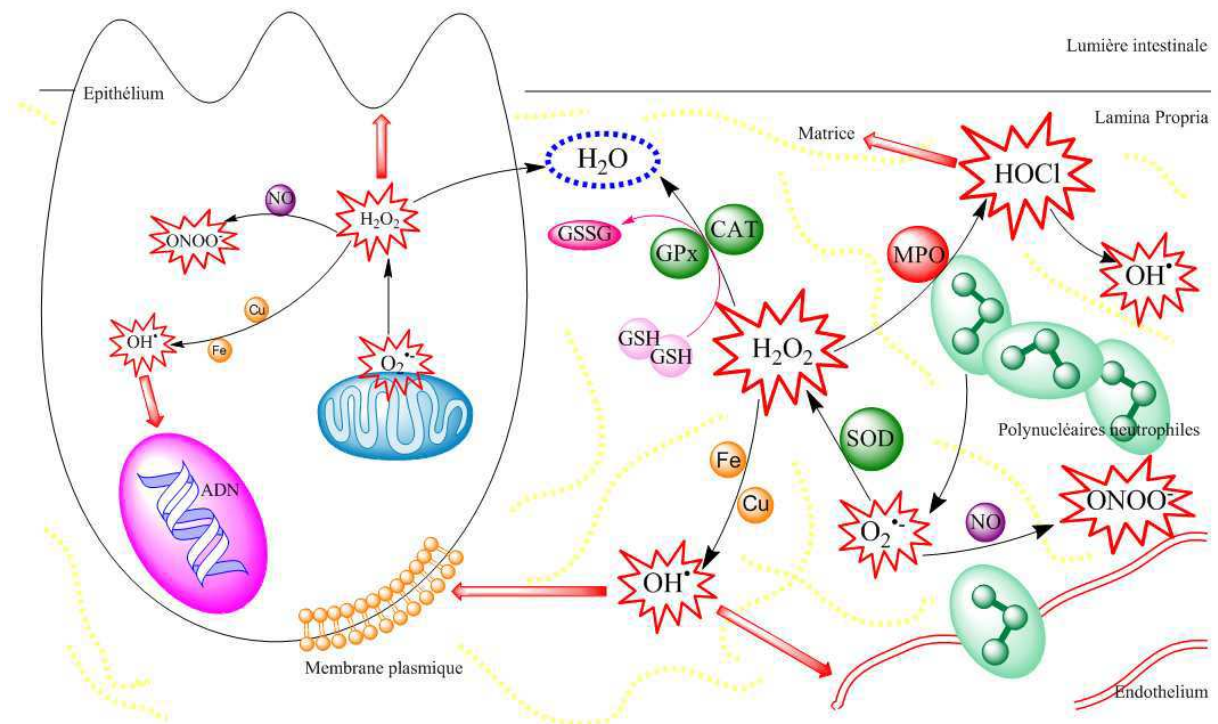


Figure 17. Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au cours de l'inflammation intestinale (D'après Kruidenier et al. 2002). CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion ; GSSG, glutathion dissulfide ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; HOCl, acide hypochloreux ; MPO, myéloperoxydase ; NO, monoxyde d'azote ; OH $^\bullet$, radical hydroxyle ; O $_2^{\bullet-}$, anion superoxyde ; ONOO $^-$, peroxynitrite.

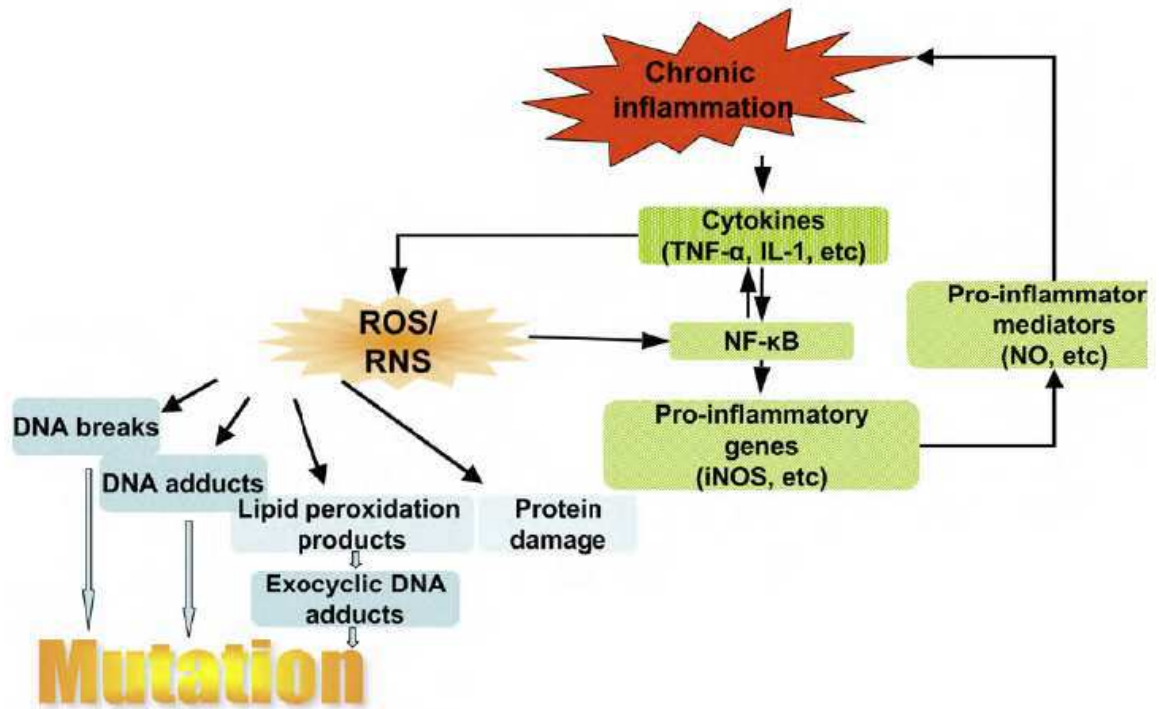


Figure 18. Inflammation chronique et mutagenèse (D'après Ferguson 2010).

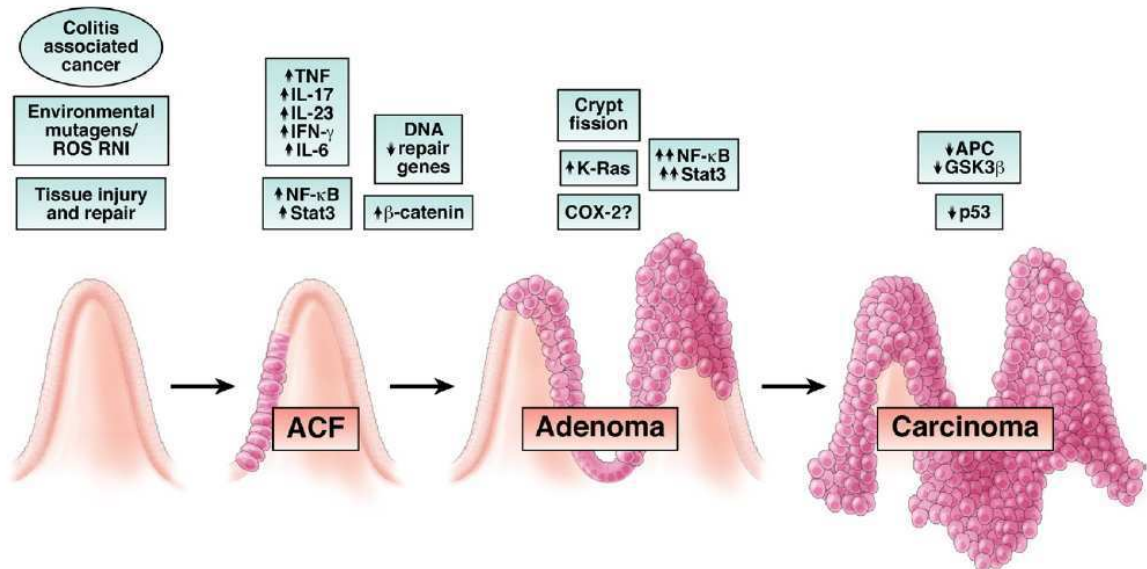


Figure 19. Développement de la carcinogénèse associée à l'inflammation intestinale (D'après Terzic et al. 2010). ACF, foyers de cryptes aberrantes.

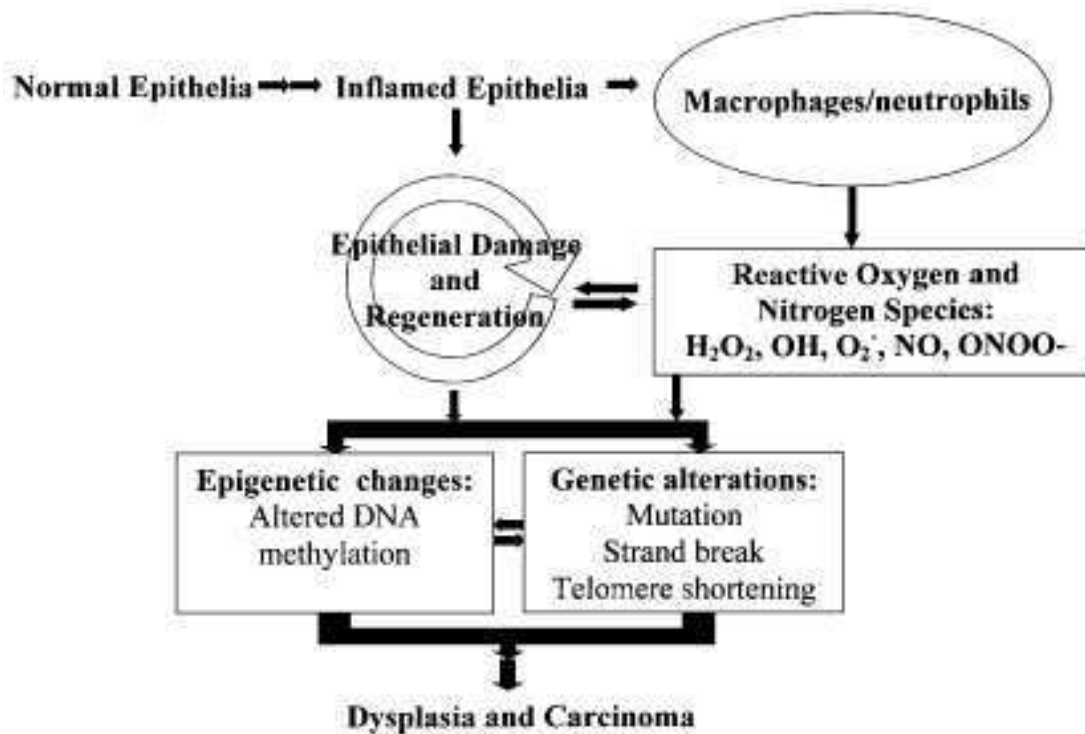


Figure 20. Relation schématique entre inflammation intestinale, stress oxydant et cancérogenèse (D'après Seril et al. 2003).

Tableau 1. Modèles animaux d'inflammation colique (D'après Blumberg et al. 1999).

Animal models of IBD.			
Spontaneous	Induced		
	Administration of exogenous agents	Gene targeting: knockout or transgenic	Transfer of cells into immunodeficient animals
Cotton top Tamarin C3H-HeJBir mouse SAMP1/Yit mouse	Enema TNBS Oxazolone Acetic acid Immune-complex-formalin Oral Indomethacin Carageenan Dextran sodium sulfate Subcutaneous Cyclosporin A Intracolonic Peptidoglycan polysaccharide	Cytokine function IL-2 ^{-/-} IL-2Rα ^{-/-} IL-10 ^{-/-} TGF-β ^{-/-} TNFΔARE IL-7-transgenic CRFB4 ^{-/-} Stat4-transgenic T cell function Gαi2 ^{-/-} TCRα ^{-/-} TCRβ ^{-/-} MHC class II ^{-/-} HLA-B27-transgenic rat IEC barrier function *Treff factor ^{-/-} N-cadherin dominant negative mdr1a ^{-/-}	CD4 ⁺ CD45RB ^{hi} into scid or Rag ^{-/-} mice Bone marrow into Tge26 mice

*Requires environmental stress such as concomitant dextran sulfate sodium. IL-2R, IL-2 receptor.

Tableau 2. Signes cliniques de l'inflammation intestinale dans le modèle DSS chez la souris.

Auteur	Souche (âge ou poids)	DSS (PM)	DSS (%)	Durée	Rétraction du côlon	Délais d'apparition			
						Diminution du poids corporel	Diarrhée	Saignements rectaux	DAI
Sanchez- Fidalgo <i>et al.</i> (2010)	C57BL/6 (6 sem)	40 kDa	3%	5 jours + H ₂ O 21 jours	ratio poids/longueur ↑ 70%	J7	J3	J5	J5
Hall <i>et al.</i> (2011)	C57BL/601aHSD (10-12 sem)	45 kDa	3%	6 jours + H ₂ O 19 jours	17% à J5 31% à J8 28% à J12 15% J25	J6 et pic à J11	J4	NC	J4
Krieglstein <i>et al.</i> (2001)	C57BL/6J664 (10-12 sem)	40 kDa	3%	7 jours	32%	J5	NC	J4	↑ à J3
Vowinkel <i>et al.</i> (2004)	C57BL/6J (120-125g)	40 kDa	3% 5%	7 jours	27% 30%	J4	NC	NC	↑ à J1
Deguchi <i>et al.</i> (2007)	Balb/c (6-8 sem)	5 kDa	3,5%	14 jours	45%	J10	NC	NC	NC
Oz <i>et al.</i> (2005)	BALB/c (6-8 sem)	NC	4%	7 jours	40%	14%	NC	NC	NC
Egger <i>et al.</i> (2000)	Balb/c (6-8 sem)	40 kDa	2,5% 5% 7,5%	7 jours	16,3% 28,9% 38%	1,3% 8,9% 25,6%	NC	NC	NC
Oh and Lim (2006)	A/J (5 sem)	36-50 kDa	3%	7 jours	40%	NC	J5	J6	J5
Arai <i>et al.</i> (1998)	CBA/J(H-2 ^k) (9 sem)	54 kDa	3%	12 jours	30%	J9	J9	NC	NC

Les données sont classées selon la souche utilisée, le type d'inflammation induite (aiguë ou chronique), le pourcentage et la durée d'administration du DSS. DAI, disease activity index ; kDa, kilo-Dalton ; NC, non communiqué.

Tableau 3. Signes cliniques de l'inflammation intestinale dans le modèle DSS chez le rat.

Auteur	Souche (âge ou poids)	DSS (PM)	DSS (%)	Durée	Réduction du côlon	Délais d'apparition			
						Diminution du BWG	Diarrhée	Saignements rectaux	DAI
Shimizu et al. (2003)	Wistar (4 sem) (8 sem)	5 kDa	2%	7 jours	NC	+	J4	J5	NC
			3%			++	J2	J4	
			4%			++	J1	J3	
			4%			+	J3	J4	
Okayama et al. (2007)	Wistar (180-200g)	5 kDa	2,5%	6 jours	8,9%	+	J4	J4	NC
Carrier et al. (2002)	Wistar (100-120g)	8 kDa	5%	7 jours	NC	oui	+	J5	NC
Damiani et al. (2007)	Wistar (100-120g)	8 kDa	5%	7 jours	NC	NC	NC	NC	NC
Holma et al. (2007)	Wistar (150-190g)	40 kDa	4%	9 jours	-	ns	J6	J6	
Kataoka et al. (2008)	Wistar (4 sem)	40 kDa	5%	5 jours	30%	stable	+	+	NC
Pelissier et al. (2006)	Wistar (180-200g)	40 kDa	5%	6 jours	23%	18%	J5	J5	NC
Carrier et al. (2006)	Wistar (100-120g)	40 kDa	5%	7 jours	NC	NC	+	+	NC
Van Crombruggen et al. (2008)	Wistar (290-370g)	40 kDa	7%	6 jours	ratio poids/longueur ↑ 85%	J1	NC	NC	↑ à J1
Baba et al. (2009)	Wistar (7 sem)	NC	4%	21 jours (<i>ad lib</i> 0,5 j)	NC	J1	+	+	NC

Les données sont classées selon la souche utilisée, le type d'inflammation induite (aiguë ou chronique), le pourcentage et la durée d'administration du DSS. DAI, disease activity index ; kDa, kilo-Dalton ; NC, non communiqué ; +, effet observé ; ++, effet observé et à apparition plus rapide que lors d'un précédent cycle ; -, absence ; +*, effet observé significativement différent d'une plus faible dose de DSS ; ns, effet observé sans atteindre le seuil de significativité.

Tableau 3. Signes cliniques de l'inflammation intestinale dans le modèle DSS chez le rat (suite).

Auteur	Souche (âge ou poids)	DSS (PM)	DSS (%)	Durée	Réduction du côlon	Délais d'apparition			
						Diminution du BWG	Diarrhée	Saignements rectaux	DAI
				7 jours	NC		+	+	
Vetuschi et al. (2002)	Sprague-Dawley (170-180g)	40 kDa	4%	7 j DSS + 7 J H ₂ O + 7 j DSS		20 à 40%	++	++	NC
				(7 j DSS + 7 J H ₂ O + 7 j DSS) x 3			++	++	
Iba et al. (2003)	Sprague-Dawley (230-270g)	NC	4%	11 jours + H ₂ O 5, 10 ou 20 j	NC	NC	J11	J11	NC
Mercier et al. (2002)	Sprague-Dawley (575g)	40kDa	5% et 2%	9 jours 9 jours	NC	J15	J3	J5	NC
Arafa et al. (2009)	Swiss albino (150-200g)	NC	3%	5 jours	ratio poids/longueur ↑ 52%	NC	NC	NC	NC
Larrosa et al. (2009)	Fisher F344 (175-200g)	40 kDa	5%	5 jours	25%	+	NC	NC	NC

Les données sont classées selon la souche utilisée, le type d'inflammation induite (aiguë ou chronique), le pourcentage et la durée d'administration du DSS. DAI, disease activity index ; kDa, kilo-Dalton ; NC, non communiqué ; +, effet observé ; ++, effet observé et à apparition plus rapide que lors d'un précédent cycle ; -, absence ; +*, effet observé significativement différent d'une plus faible dose de DSS ; ns, effet observé sans atteindre le seuil de significativité.

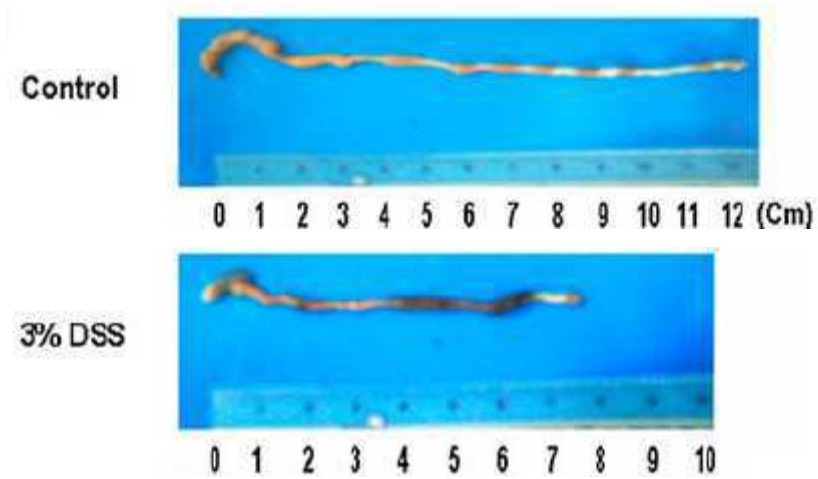


Figure 21. Réduction de la longueur du côlon induite par le DSS. Exemple chez la souris A/J recevant du DSS à 3% pendant 7 jours (*D'après Oh and Lim 2006*).

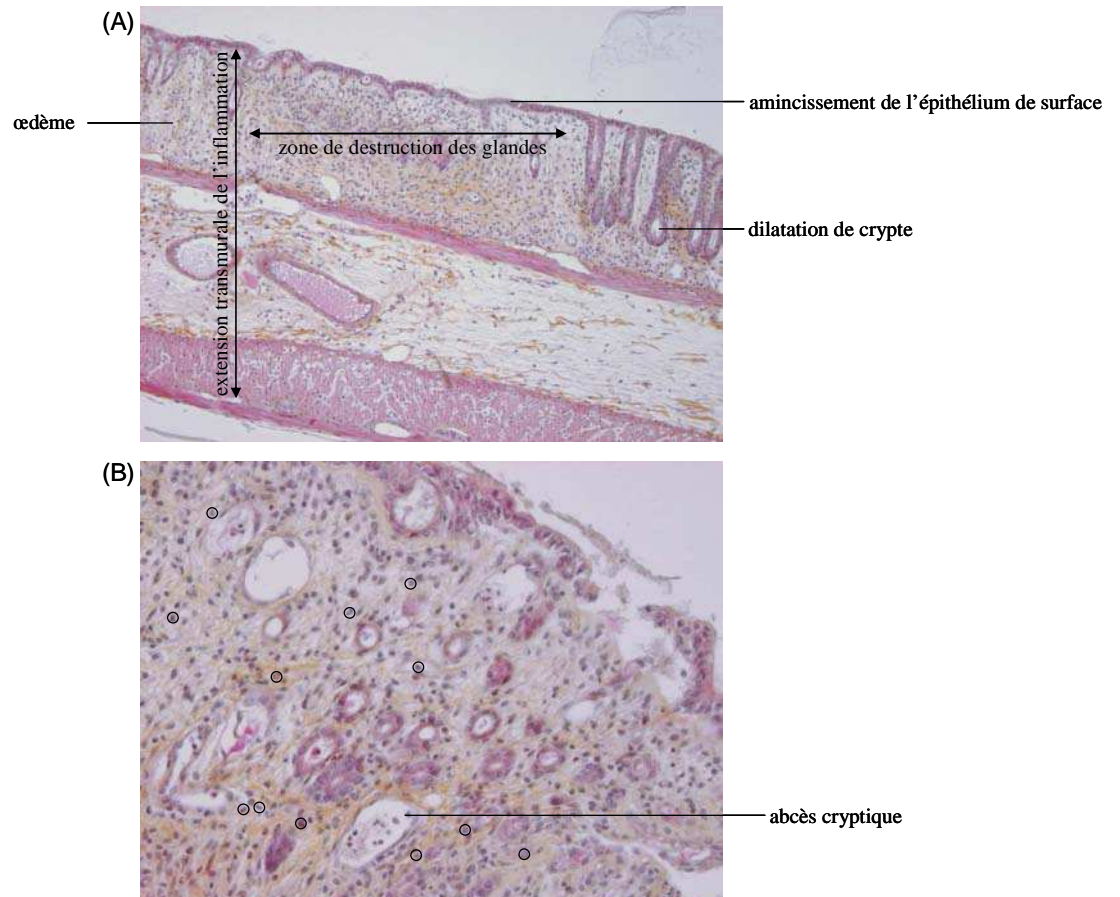


Figure 22. Altérations histologiques de la muqueuse colique suite à l'administration de DSS à 4% pendant 7 jours chez le rat. Coloration HPS. (A) grossissement x 4 ; (B) grossissement x 20. ○, PNN infiltrant la muqueuse.

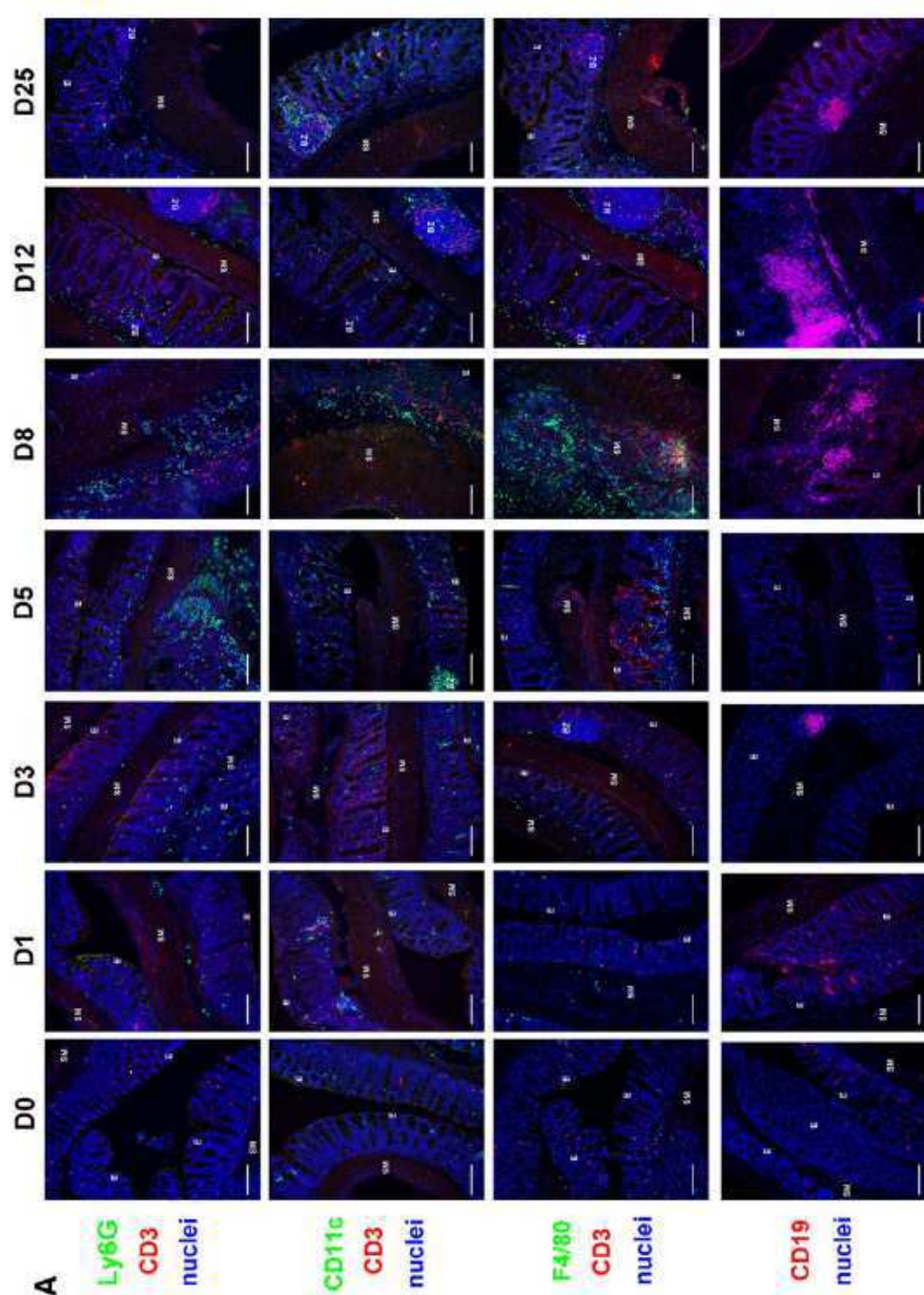


Figure 23. Visualisation *in situ* de l'infiltration de la muqueuse colique de souris par les cellules immunitaires lors de l'inflammation induite par administration de DSS (D'après Hall et al. 2011). Les cellules immunitaires sont marquées avec différents anticorps : Ly6G (PNN), CD11c (cellules dendritiques), F4/80 (macrophages) (vert) ; CD3 (cellules T) (rouge) ; CD19 (cellules B) (rouge). Les noyaux sont marqués en bleu.

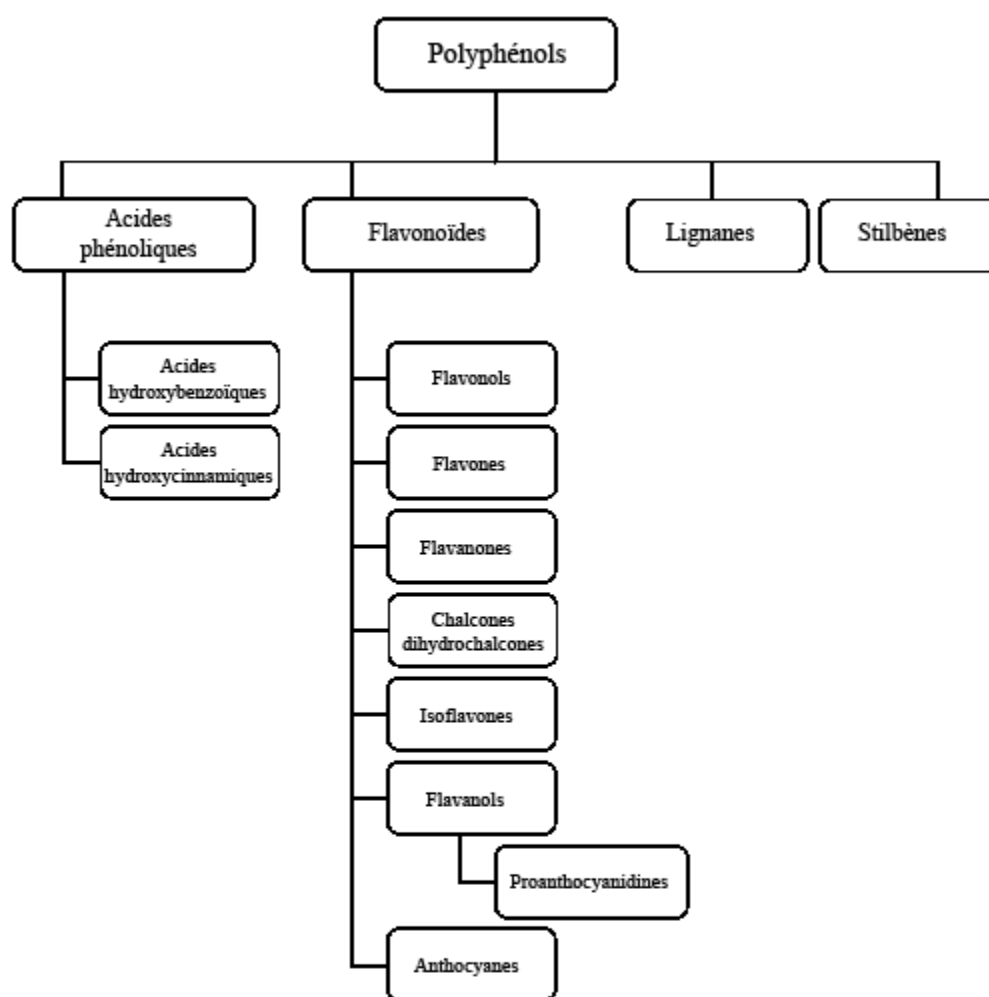
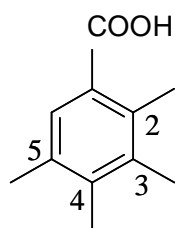
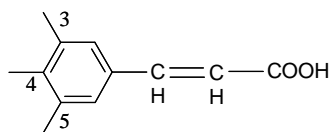


Figure 24. Classification des polyphénols (*D'après Liu 2004*).



Composés	2	3	4	5
Acide 4-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Acide 3-hydroxybenzoïque	H	OH	H	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

Figure 25. Structure des acides hydroxybenzoïques.



Composés	3	4	5
Acide cinnamique	H	H	H
Acide 4-coumarique	H	OH	H
Acide 3-coumarique	OH	H	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OH	OCH ₃	H
Acide isoférulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure 26. Structure des acides hydroxycinnamiques.

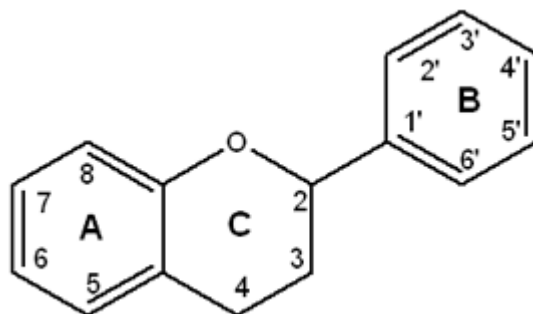
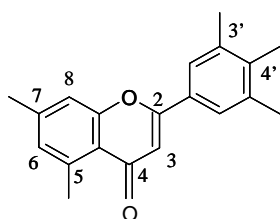
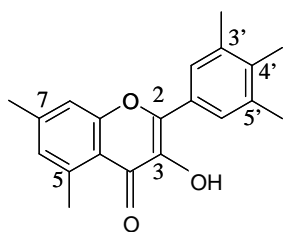


Figure 27. Structure de base des flavonoïdes

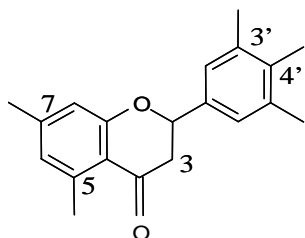


Composés	5	7	3'	4'
Chrysine	OH	OH	H	H
Apigénine	OH	OH	H	OH
Lutéoline	OH	OH	OH	OH
Diosmétine	OH	OH	OH	OCH ₃
Chrysoériol	OH	OH	OCH ₃	OH

Figure 28. Structure des flavones.



Composés	5	7	3'	4'	5'
Fisétine	H	OH	OH	OH	H
Galangine	OH	OH	H	H	H
Kaempférol	OH	OH	H	OH	H
Kaempféride	OH	OH	H	OCH ₃	H
Quercétine	OH	OH	OH	OH	H
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH
Tamarixétine	OH	OH	OH	OCH ₃	H
Isorhamnétine	OH	OH	OCH ₃	OH	H
Rhamnétine	OH	OCH ₃	OH	OH	H

Figure 29. Structure des flavonols.

Composés	5	7	3'	4'
Naringénine	OH	OH	H	OH
Eriodictyol	OH	OH	OH	OH
Hespéridine	OH	OH	OH	OCH ₃
Homoériodictyol	OH	OH	OCH ₃	OH
Isosakuranétine	OH	OH	H	OCH ₃
Liquiritigénine	H	OH	H	OH

Figure 30. Structure des flavanones.

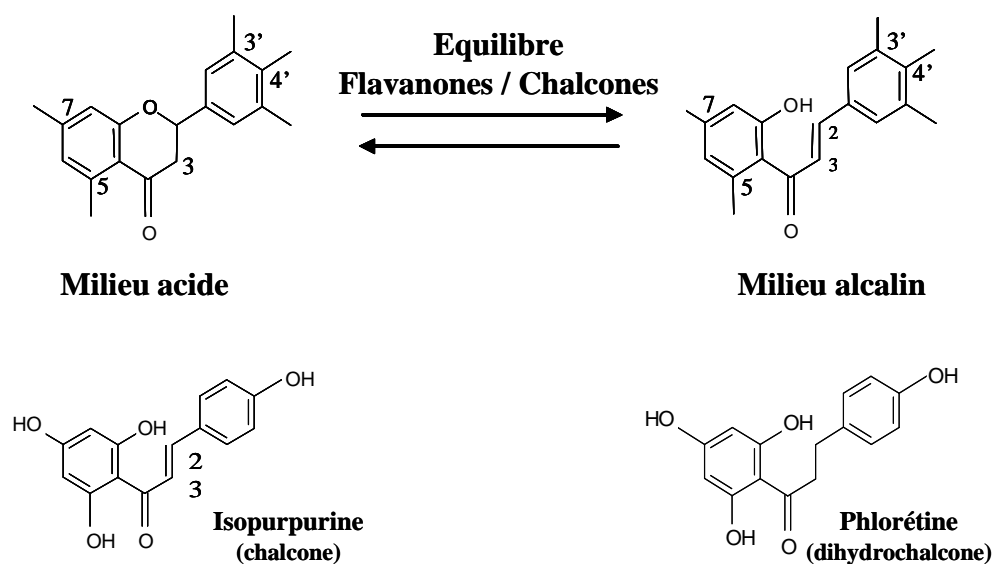


Figure 31. Structure des chalcones et dihydrochalcones.

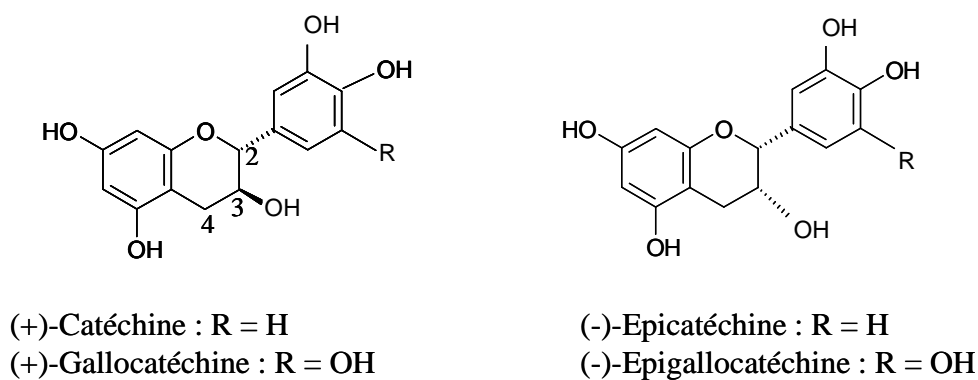


Figure 32. Structure des flavanols.

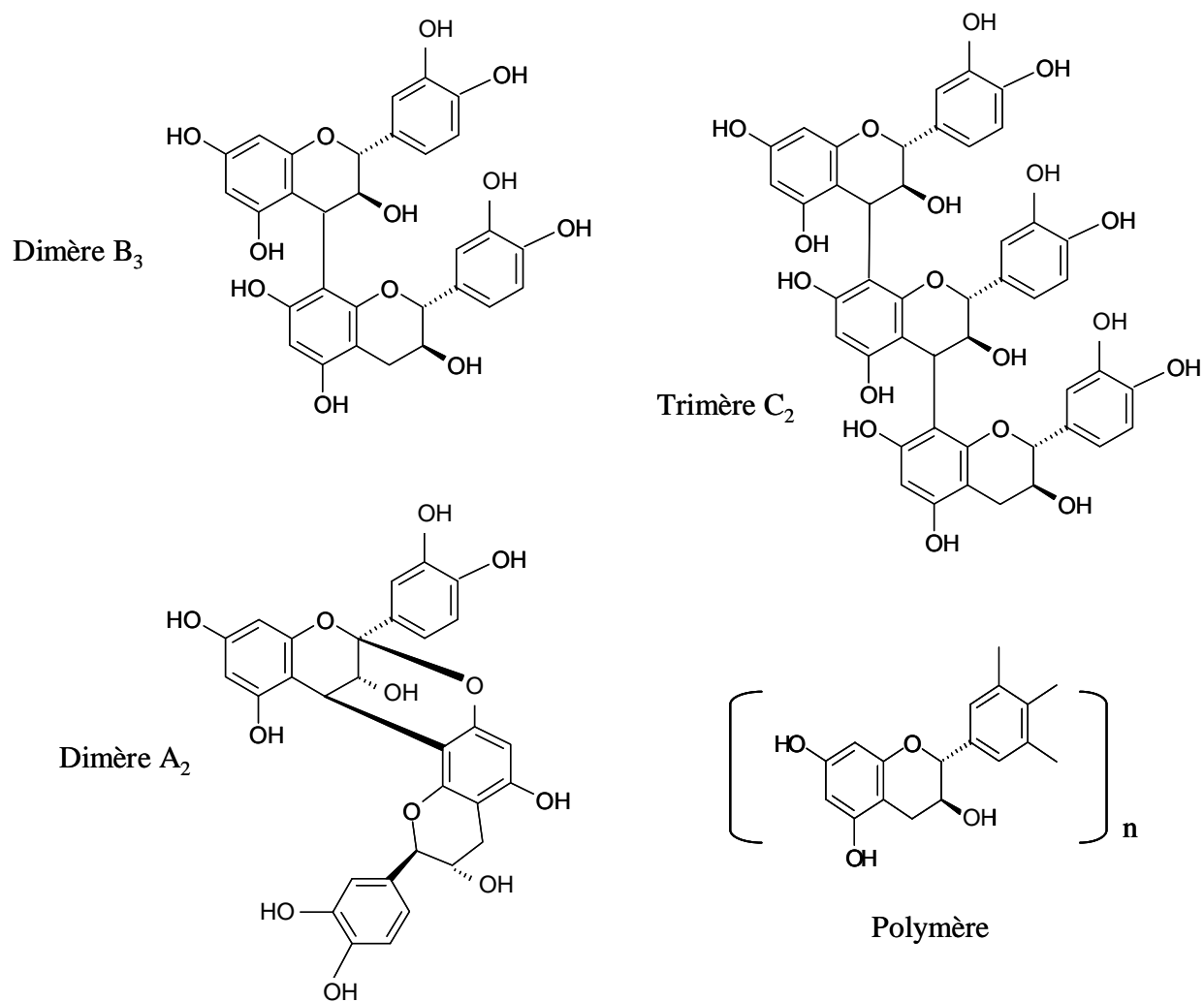
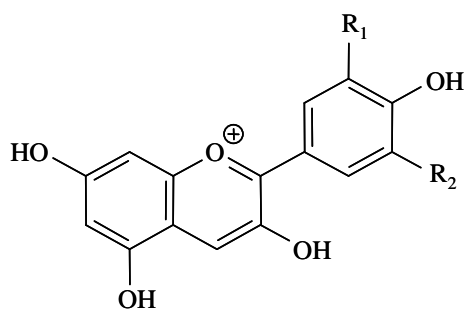
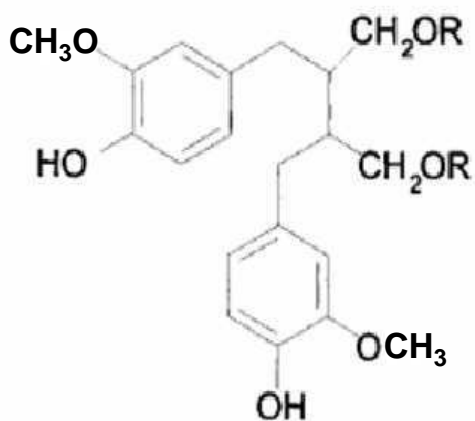


Figure 33. Structure des proanthocyanidines.



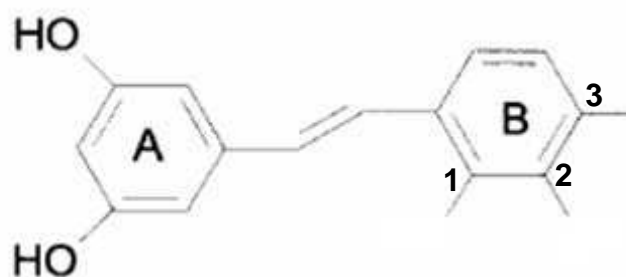
Composés	R1	R2
Pélgargonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Delphinidine	OH	OH
Péonidine	OCH3	H
Pétunidine	OCH3	OH
Malvidine	OCH3	OCH3

Figure 34. Structure primaire des anthocyanes.



R=H : Secoisolariciresinol
R=Glucose : Diglucoside

Figure 35. Structure des lignanes.



Composés	1	2	3	Acide phénolique précurseur
Pinosylvine	H	H	H	Acide cinnamique
Resvérol	H	H	OH	Acide p-coumarique
Picéatannol	H	OH	OH	Acide caféique
Rhapontigénine	H	OH	OCH ₃	Acide isoférulique

Figure 36. Structure des stilbènes.

Tableau 4. Estimation de la consommation en flavonoïdes chez l'adulte dans différents pays (D'après Erdman et al. 2007).

Polyphenols	Country ¹	Intake, mg/d	Reference
Flavonols	Netherlands	21–29	Hertog et al. (99); Hertog et al. (267); Geleijnse et al. (108)
	Germany	13.1	Linseisen et al. (268)
	Germany	22.6	Radtke et al. (42)
	Japan	15.3	Kimira et al. (269)
	Japan	15.6	Arai et al. (270)
	Japan	64	Hertog et al. (271)
	Korea	24.6	Park et al. (272)
	UK	26	Hertog et al. (104)
	U.S.	9.4	Chun et al. (266)
	U.S.	9.4	Chun et al. (266)
Flavones	Netherlands	1.6	Hertog et al. (267)
	Japan	1	Kimira et al. (269)
	Japan	1.1	Arai et al. (270)
	Korea	2.1	Park et al. (272)
	U.S.	1.3	Chun et al. (266)
Flavanones	Germany	21	Linseisen et al. (268)
	Germany	29.4	Radtke et al. (42)
	Finland	20	Knekt et al. (148)
	Greece	31–78	Lagiou et al. (156,273,274)
	Italy	31	Bosetti et al. (275)
	Australia	23	Lyons-Wall et al. (276)
	U.S.	2.7	Chun et al. (266)
	U.S.	2.7	Chun et al. (266)
Isoflavones	Netherlands	0.9	Boker et al. (277)
	Ireland, Italy, Netherlands, UK	<1	van Erp-Baart et al. (278)
	UK	<1	Jones et al. (279)
	UK	3	Clarke et al. (280)
	Finland	0.8	Valsta et al. (281)
	U.S.	0.5	Chun et al. (266)
	U.S.	0.8	de Kleijn et al. (282)
	U.S.	2.9	Horn-Ross et al. (283)
	U.S.	11	Kirk et al. (284)
	U.S.	14–25	Rimm et al. (103); Yochum et al. (105); Sesso et al. (110)
	Japan	31.7	Wakai et al. (285)
	Japan	39.4	Kimira et al. (269)
	Japan	46.5	Arai et al. (270)
	Japan	63.9	Arai et al. (286)
	Korea	24.6–38	Park et al. (272)
	Finland	4–6	Hertog et al. (271); Knekt et al. (148)
	Germany	11	Linseisen et al. (268)
	Netherlands	50	Arts et al. (151)
	U.S.	4–25	Gu et al. (11); Arts et al. (287)
Flavan-3-ols (monomeric)	U.S.	121	Chun et al. (266)
	Germany	6.5	Linseisen et al. (268)
	U.S.	1.3	Chun et al. (266)
	U.S.	58	Gu et al. (11)
Anthocyanidins	U.S.	58	Gu et al. (11)
Proanthocyanidins	U.S.	58	Gu et al. (11)

¹ UK, United Kingdom; U.S., United States.

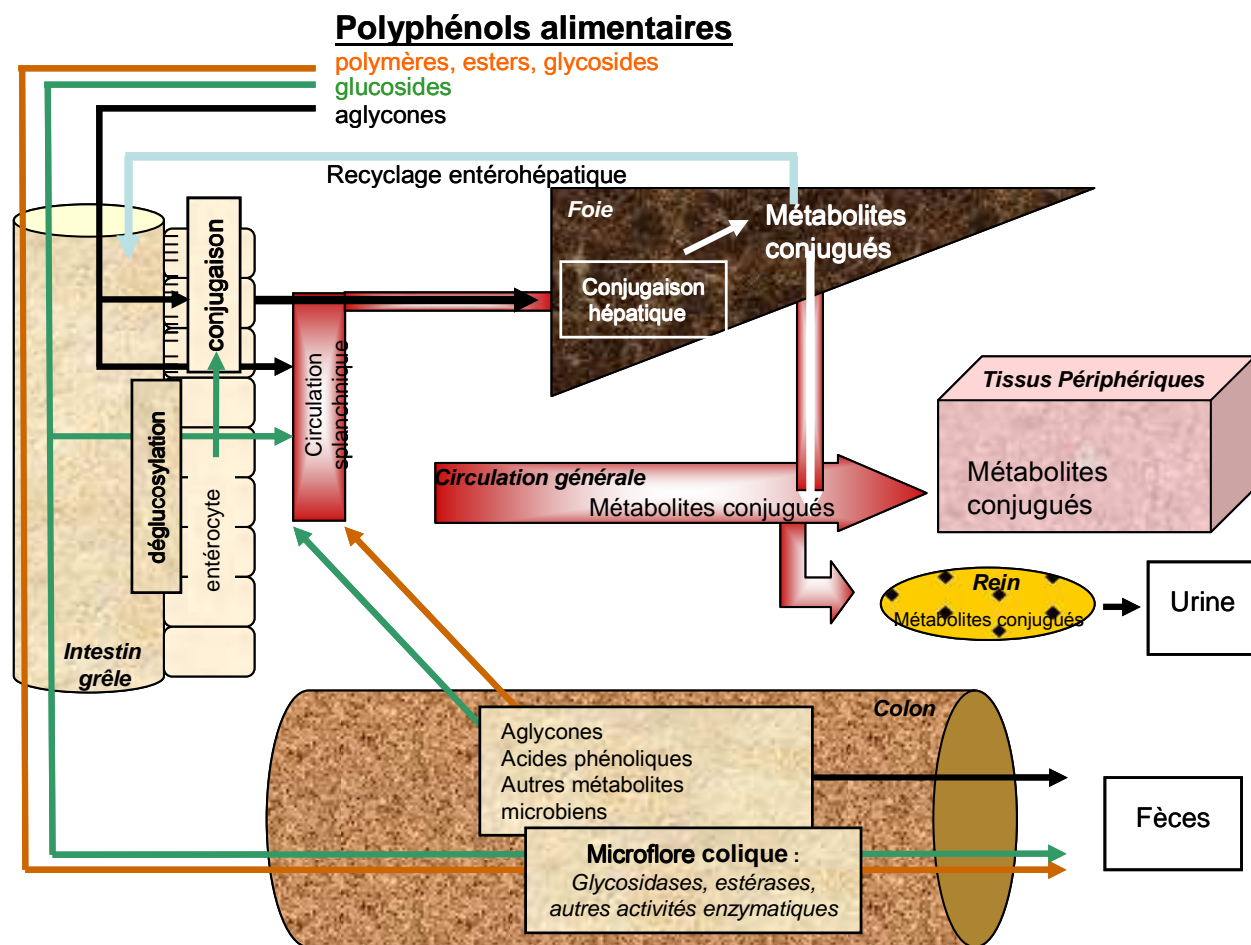


Figure 37. Schéma général du métabolisme des polyphénols (D'après Mauray 2009).

Tableau 5. Relation structure-activité antioxydante (mesurée par la méthode TEAC) des polyphénols (*D'après Rice-Evans et al. 1996*).

Compound	Free OH-Substituents	Glycosylated Position	TEAC (mM)	<i>n</i>	Family
Epicatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 3'', 4'', 5''		4.9 ± 0.02	[3]	flavanol
Epigallocatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''		4.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		4.7 ± 0.1	[6]	flavonol
Delphinidin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		4.44 ± 0.11	[5]	anthocyanidin
Cyanidin	3, 5, 7, 3', 4'		4.4 ± 0.12	[5]	anthocyanidin
Epigallocatechin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Keracyanin	5, 7, 3', 4'	3-rut	3.25 ± 0.1	[3]	anthocyanin
Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.1 ± 0.30	[6]	flavonol
Gallic acid	3, 4, 5		3.01 ± 0.05	[7]	hydroxybenzoate
Ideain	5, 7, 3', 4'	3-gal	2.9 ± 0.03	[3]	anthocyanin
Morin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		2.55 ± 0.02	[3]	flavonol
Epicatechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.5 ± 0.02	[6]	flavanol
Gallic acid methyl ester	3, 4, 5		2.44 ± 0.03	[3]	hydroxybenzoate
Catechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.4 ± 0.05	[9]	flavanol
Rutin	5, 7, 3', 4',	3-rut	2.4 ± 0.06	[7]	flavonol
Apigenidin	5, 7, 4'		2.35 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Peonidin	3, 5, 7, 4'	3'-OMe	2.22 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Luteolin	5, 7, 3', 4'		2.1 ± 0.05	[4]	flavone
Malvidin	3, 5, 7, 4'	3',5'-di-OMe	2.06 ± 0.1	[4]	anthocyanidin
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'		1.9 ± 0.03	[6]	flavanone
Oenin	5, 7, 4'	3',5'-diOme	1.78 ± 0.02	[3]	anthocyanin
Luteolin-4'-glucoside	5, 7, 3'	3-gluc 4'-gluc	1.74 ± 0.09	[4]	flavone
Naringenin	5, 7, 4'		1.53 ± 0.05	[4]	flavanone
Apigenin	5, 7, 4'		1.45 ± 0.08	[6]	flavone
Chrysin	5, 7		1.43 ± 0.07	[6]	flavone
Hesperitin	3, 5, 7, 3'	4'-OMe	1.37 ± 0.08	[3]	flavanone
Kaempferol	3, 5, 7, 4'		1.34 ± 0.08	[6]	flavonol
Pelargonidin	3, 5, 7, 4'		1.30 ± 0.1	[6]	anthocyanidin
Hesperidin	3, 5, 3'	4'-OMe 7-rut	1.08 ± 0.04	[5]	flavanone
Luteolin-3',7-diglucoside	5, 4'	3',7-digluc	0.79 ± 0.04	[4]	flavone
Narirutin	5, 4'	5-rut	0.76 ± 0.05	[3]	flavanone

Tableau 6. Effets des polyphénols sur les marqueurs inflammatoires chez l'individu sain (*D'après Gonzalez-Gallego et al. 2010*).

Product	Subject description	Dosage/duration of intake	Results	Reference
Fruits and vegetables	7802 Japanese adults	Dietary intake	Reduced plasma CRP	Nanri <i>et al.</i> ⁽⁶⁸⁾
Fruits and vegetables	285 adolescents, 13–17 years	Dietary intake	Reduced plasma CRP, IL-6 and adhesion factors	Holt <i>et al.</i> ⁽⁷⁰⁾
Anthocyanin extract from blueberries	120 men and women, 40–74 years	300 mg/d/3 weeks	Decreased plasma IL-4, IL-8, IL-13 and IFN- γ	Karlsen <i>et al.</i> ⁽⁷¹⁾
Cherries	Eighteen men and women	280 g/d/28 d	Decreased plasma CRP and NO	Kelley <i>et al.</i> ⁽⁷²⁾
Flavonoids	8335 adults over 19 years	Dietary intake	Reduced plasma CRP	Chum <i>et al.</i> ⁽⁷³⁾
Foods rich in antioxidants	704 adult men, average age 70 years	Dietary intake	Improvement in CRP, IL-6 and F2-isoprostanes	Helmerson <i>et al.</i> ⁽⁷⁴⁾
Fruit and vegetable juice powder	Fifty-nine law students	77 d	Increased circulating $\gamma\delta$ -T cells	Nantz <i>et al.</i> ⁽⁷⁵⁾
Tea	1031 Belgian men	Dietary intake	Decreased plasma CRP	De Bacquer <i>et al.</i> ⁽⁷⁶⁾
Black tea	Thirty-seven non-smoking men, 18–55 years	6 weeks	Decreased platelet activation and plasma CRP	Steptoe <i>et al.</i> ⁽⁷⁷⁾
Fruits, nuts and vegetables	Forty-eight men, 20–48 years	Intake of food concentrate/twice daily/4 weeks	Decreased blood ICAM-1 and VCAM-1	Schoen <i>et al.</i> ⁽⁷⁸⁾
Black tea	Sixty-six men and women, average age 54 years	900 ml/d/4 weeks	= Plasma CRP and urinary 8-OHdG	Widlansky <i>et al.</i> ⁽⁷⁹⁾
Berries and apples	Seventy-seven men and women, 17–52 years	6 weeks	= Plasma CRP and ICAM-1	Freese <i>et al.</i> ⁽⁸⁰⁾
Black or green tea	Sixty-four smokers	4 weeks	= Plasma IL-6, TNF- α and CRP	De Maat <i>et al.</i> ⁽⁸¹⁾
Pomegranate extract	Eleven men and women	800 mg	Increased ORAC = Plasma IL-6	Mertens-Talcott <i>et al.</i> ⁽⁸²⁾

CRP, protéine réactive C ; IFN- γ , interféron γ ; ICAM, intercellular adhesion molecule; NO, monoxyde d'azote ; ORAC, oxygen radical absorbance capacity ; VCAM, vascular cellular adhesion molecule; 8-OHdG, 8-oxo-2'-déoxyguanosine.

Tableau 7. Effets cliniques des polyphénols des fruits et du thé (*D'après Gonzalez-Gallego et al. 2010*).

Product	Disease	Subject description	Dosage/duration of intake	Results	Reference
PFP extract	Asthma	Forty-three patients (sixteen men/twenty-seven women), 18–60 years	150 mg/d per 4 weeks	Decreased clinical symptom of asthma	Watson <i>et al.</i> ⁽⁸⁷⁾
Drinks containing apple polyphenols	Allergic rhinitis	Thirty-three patients (9/24), 15–65 years	50 or 200 mg/d per 4 weeks	Decreased clinical symptom of persistent allergic rhinitis	Enomoto <i>et al.</i> ⁽⁸⁸⁾
RGJ	Atherosclerotic CVD	Thirty-two haemodialysis patients (16/16), 33–79 years	50 ml/twice daily per 2 weeks	Decreased neutrophil NADPH oxidases activity, plasma oxidised LDL and MCP-1	Castilla <i>et al.</i> ⁽⁸⁹⁾
Quercetin	Chronic prostatitis	Thirty patients, 26–72 years	500 mg/twice daily per 4 weeks	Symptomatic improvement in chronic pelvic pain syndrome	Shoskes <i>et al.</i> ⁽⁹¹⁾
Quercetin	Interstitial cystitis	Twenty-two patients (5/17), average age 53 years	500 mg twice daily per 4 weeks	Symptomatic improvement	Katske <i>et al.</i> ⁽⁹²⁾
Quercetin + vitamin C	Rheumatoid arthritis	Twenty patients	166 mg quercetin + 133 mg vitamin C/3 capsules/d per 4 weeks	= Disease severity = Blood CRP and pro-inflammatory cytokines	Bae <i>et al.</i> ⁽⁹³⁾
Green tea extracts	Type 2 diabetes	Fifty-five patients (31/24), average age 54 years	9 g/d per 4 weeks	= Plasma CRP, IL-6, insulin resistance and adiponectin levels	Ryu <i>et al.</i> ⁽⁹⁵⁾
Green tea extracts	Type 2 diabetes	Sixty-six patients with borderline diabetes or diabetes (53/13), 32–73 years	544 mg/d per 8 weeks	= Blood glucose, inflammatory markers and insulin resistance	Fukino <i>et al.</i> ⁽⁹⁶⁾
GSE	Type 2 diabetes	Thirty-two patients (16/16), average age 62 years	600 mg/d per 4 weeks	Improvement in markers of insulin resistance and inflammation Decrease blood CRP	Kar <i>et al.</i> ⁽⁹⁷⁾
LBR	Oesophageal adenocarcinoma	Ten patients with Barrett's oesophagus (pre-malignant lesions)	32–45 g/d per 24 weeks	Decreased urinary excretion of 8-iso-PGF2 and 8-OHdG	Kresty <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁹⁾
LBR	Oral intraepithelial neoplasia	Twenty patients with premalignant oral lesions (8/12), 26–76 years	0.5 g of gel (10% LBR) topically/4 times daily per 6 weeks	Decreased epithelial COX-2 and iNOS and genes associated with inhibition of apoptosis	Mallery <i>et al.</i> ⁽¹¹⁰⁾
Green tea extracts	Prostate carcinoma	Forty-two patients with androgen-independent prostate, average age 70 years	6 g/6 divided doses per day per 8 weeks	= PSA Decreased anti-neoplastic activity	Jatoi <i>et al.</i> ⁽¹¹²⁾
Pomegranate juice	Prostate carcinoma	Forty-six patients with recurrent prostate cancer	240 ml/d per 13 months	Prolongation of disease stabilisation = PSA	Pantuck <i>et al.</i> ⁽¹¹³⁾
Green tea polyphenols	Liver carcinoma	124 patients in high risk of liver cancer	500–1000 mg/d per 12 weeks	Decreased urinary 8-OHdG	Luo <i>et al.</i> ⁽¹¹⁴⁾

COX, cyclo-oxygénase ; CRP, protéine réactive C ; GSE, extrait de pépin de raisin ; iNOS, nitrique oxyde synthase inductible ; LBR, framboises noires lyophilisées ; MCP, monocyte chemoattractant protein ; PFP, écorce de fruits de la passion ; PSA, antigène spécifique de la prostate ; RGJ, jus de raisin rouge ; 8-iso-PG, 8-iso prostaglandine ; 8-OHdG, 8-oxo-2'-déoxyguanosine.

Tableau 8. Effets des polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation *in vitro*

Polyphénol étudié	Effets anti-inflammatoires	Type cellulaire	Stimulus	Doses de polyphénols	Références
Hydroxytyrosol	↓ : MDA (dose-dépendant), hydroperoxydes (dose-dépendant), 7-kétocholestérol ↑ : α -tocophérol	Caco-2	Tert-butyl hydroperoxyde (2,5 mM)	5 – 25 μ M	Deiana <i>et al.</i> (2010)
Quercétine	inhibition de NF- κ B et activation de la sécrétion d'IL-8	HT29, HCT116, SW620	TNF- α	50 – 100 μ M	Kim <i>et al.</i> (2005)
Génistéine	↓ : sécrétion IL-6, translocation nucléaire de STAT 3 induite par IL-6	Caco-2	Non-stim ou IL-6	2-100 μ M	Paradkar <i>et al.</i> (2004)
Epigallocatechine-3-gallate	Inhibition activation de NF- κ B, phosphorylation I κ B et activité IKK	IEC-6	TNF- α	25-200 μ M	Yang <i>et al.</i> (2001)
	↓ : sécrétion IL-8, MIP-3 α et PGE ₂ , expression ARNm IL-8, MIP-3 α , TNF- α , COX-2	HT-29 ou T84	TNF- α	25-50 μ M	Porath <i>et al.</i> (2005)
Acide ellagique	↓ : activité NF- κ B ↑ : phosphorylation I κ B, sécrétion IL-8	Caco-2	IL-1 β , TNF- α ou LPS	50 μ M	Romier <i>et al.</i> (2008)
Resvératrol	↓ : activité NF- κ B ↑ : sécrétion IL-8	Caco-2	IL-1 β , TNF- α ou LPS	50 μ M	Romier <i>et al.</i> (2008)
Polyphénols du thé vert	↓ : activité de liaison de STAT α , expression protéine et ARNm iNOS Inhibition de la phosphorylation de STAT α	DLD-1	Mix IFN- γ , IL-1 β , TNF- α	2-200 μ g/l	Tedeschi <i>et al.</i> (2004)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; -, absence d'effet ; non-stim, non stimulée ; COX-2, cyclo-oxygénase 2 ; IFN- γ , interféron γ ; IKK, I κ B kinase ; I κ B, inhibiteur κ B ; iNOS, NO synthase inductible ; LPS, lipopolysaccharide ; MDA, malondialdéhyde ; MIP, macrophage inflammatory protein ; NF- κ B, nuclear factor κ B ; STAT, signal transducer and activator of transcription protein ; TNF- α , tumor necrosis factor α .

Tableau 9. Effets des polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation *in vivo*

Polyphénol étudié	Effets anti-inflammatoires	Animal	Inducteur d'inflammation	Doses de polyphénols	Références
Quercétine	- : sévérité de la colite, expression ARNm IL-1 β et IL-6	Souris	DSS (5% - 7 j)	2- 200 mg/kg/j v.o. (7 j avant ii et pendant 14j ou 3 j après ii et pendant 4 j)	Kwon <i>et al.</i> (2005)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, effets dose dépendants	Rat	TNBS (15 mg)	20 – 100 μ M (1 j après ii, pendant 6 j)	Kim <i>et al.</i> (2005)
Quercitrine	↓ : sévérité de la colite , activités MPO et AP ↑ : taux glutathion	Rat	DSS(2-5%, 8 ou 15 j)	1 ou 5 mg/kg/j, v.o. (8 ou 5 j avec ii ; 10 j après ii)	Camuesco <i>et al.</i> (2004)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO et AP, taux TNF- α , IL-1 β et LTB $_4$, expression des protéines iNOS et COX-2 ↑ : GSH colique	Rat	DSS (2 et 5% - 15 j)	1 mg/kg/j v.o. (5 j après ii et pendant 10 j) et avec régime enrichi en huile d'olive et de poisson	Camuesco <i>et al.</i> (2006)
Rutoside	↓ : sévérité de la colite, activités MPO, AP et iNOS, activation NF- κ B ↑ : GSH colique	Rat	TNBS (10 mg)	10 – 25 mg/kg/j, v.o (48, 24 ou 1h avant ii, ou 24h après ii)	Cruz <i>et al.</i> (1998)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO	Rat	TNBS (15 mg)	10 mg/kg/j v.o. (1 j après ii et pendant 6 j)	Kim <i>et al.</i> (2005)
	↓ : sévérité de la colite, expression ARNm IL-1 β et IL-6 ; effets dose-dépendants	Souris	DSS (5% - 7j)	2 -200 mg/kg/j v.o. (7 j avant ii et pendant 14j ou 3 j après ii et pendant 4 j)	Kwon <i>et al.</i> (2005)
Hespéridine	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, taux MDA et IL-6 - : taux IL-4	Souris	DSS (5 % - 7 j)	10 – 80 mg/kg v.o. (7 j avec ii)	Xu <i>et al.</i> (2009)
Wogonine	↓ : sécrétion par les lymphocytes des ganglions mésentériques d'IgE, IL-4, IL-5, IL-10 ↑ : taux IgA fécal, sécrétion par les lymphocytes des ganglions mésentérique d'IgA, IFN- γ et IL-2	Souris	DSS (5% - 5 j)	20 mg/kg/j v.o. (5 j après ii et pendant 14 j)	Lim (2004)
Morine	↓ : sévérité de la colite, activité MPO et iNOS, taux IL-1 β , LTB $_4$, MDA	Rat	TNBS (30 mg)	25 mg/kg/j v.o. (2 h après ii pendant 1, 2, 3 ou 4 sem)	Galvez <i>et al.</i> (2001)
Mélange daidzéine et génistéine	↓ : métallothionéine et expression ARNm Mn-SOD	Souris	LPS (i.p. 6 μ g)	105 mg/kg/j, v.o. (4 sem avant ii et 48h après)	Paradkar <i>et al.</i> (2004)

Tableau 9. Effets des polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation *in vivo* (suite)

Epigallocatechine-3-gallate	↓ : sévérité de la colite, activité MPO ↑ : activité SOD	Rat	TNBS (24 mg)	30 mg/kg/j v.o. (10 j avant ii et 12 h après ii)	Mochizuki and Hasegawa (2005)
Théarubigine	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, taux MDA, expression ARNm IFN- γ , IL-12, IL-4 et iNOS Inhibition de l'activation de NF- κ B	Souris	TNBS (6 mg)	40 – 100 mg/kg/j v.o. (10 j avant ii et 8 j après ii)	Maity <i>et al.</i> (2003)
Curcumine	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, infiltration du côlon par cellules CD4+ et CD8+, détection NF- κ B ↑ : détection I κ B	Souris	DSS (3,5% - 14j)	4 mg/kg/j v.o. (pendant 14 j ii)	Deguchi <i>et al.</i> (2007)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, taux TNF- α et NO, activation MAPK p38, expression iNOS et COX-2 ↑ : taux IL-10	Rat	TNBS (30 mg)	50 – 100 mg/kg/j v.o. (24h après ii et pendant 14 j)	Camacho-Barquero <i>et al.</i> (2007)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, production TNF- α , NO, taux de MDA ↑ : GSH colique, activité GST	Rat	DSS (3% - 5j)	100 mg/kg i.p. (tous les j à partir de 2 j avant ii)	Arafa <i>et al.</i> (2009)
Picéatannol	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, production NO, PGE ₂ , expression ARNm iNOS, COX-2 et sous-unités de NF- κ B, translocation nucléaire de NF- κ B	Souris	DSS (5% - 7 j)	1 - 10 mg/kg/j v.o. (pendant les 7 j)	Kim <i>et al.</i> (2008)
Resvératrol	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, production IL-1 β et PGD ₂ , expression COX-2 ↑ : apoptose cellules coliques	Rat	TNBS (10 mg)	5 et 10 mg/kg/j v.o. (48, 24 et 1h avant ii et 24h après ii)	Martin <i>et al.</i> (2004)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, taux TNF- α , expression COX-2 et NF- κ B ↑ : taux PGE ₂ , apoptose cellules coliques	Rat	TNBS (30 mg)	10 mg/kg/j v.o. (24h après ii et pendant 14 j)	Martin <i>et al.</i> (2006)
	↓ : sévérité de la colite, taux NO et PGE ₂ , expression des protéines COX-2 et PTGES - : taux TBARS colique, pouvoir antioxydant du plasma	Rat	DSS (5% - 5 j)	1 mg/kg/j v.o. (20 j avant ii et pendant 5 j avec ii)	Larrosa <i>et al.</i> (2009)
	↓ : sévérité de la colite, taux TNF- α , IL-1 β , expression protéines COX-2, PGES-1 ↑ : taux IL-10	Souris	DSS (3% - 5 j + 21 j H ₂ O)	3 mg/kg/j v.o. (30 j avant ii, 5 j avec ii, 21 j après ii)	Sanchez-Fidalgo <i>et al.</i> (2010)
	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, MDA, IL-8, IFN- γ ↑ : activité SOD et GPx, TNF- α	Souris	DSS (5% - 7j) + H ₂ O 7j	30 – 60 mg/kg/j	Yao <i>et al.</i> (2010)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; -, absence d'effet ; v.o., voie orale ; ii, inducteur d'inflammation ; i.p., injection intra-péritonéale ; AP, alcaline phosphatase ; COX-2, cyclooxygénase-2 ; GPX, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion ; GST, glutathion S transférase ; IFN- γ , interféron γ ; IgA, immunoglobuline A ; IgE, immunoglobuline E ; iNOS, nitric oxyde synthase inductible ; LTB₄, leucotriène B₄ ; MAPK, mitogen activated protein kinase ; MDA, malondialdéhyde ; MPO, myéloperoxydase ; NF- κ B, nuclear factor κ B ; PGD₂, prostaglandine D₂ ; PGE₂, prostaglandine E₂ ; PTGES, PGE-1, prostaglandine-E synthase ; SOD, superoxyde dismutase ; TBARS, thiobarbituric reactive substances ; TNF- α , tumor necrosis factor α .

Tableau 10. Effets d'extraits végétaux riches en polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation *in vivo*

Extrait étudié	Effets sur l'inflammation	Animal	Inducteur d'inflammation	Doses d'extraits	Références
Extrait méthanolique de <i>Plantago lanceolata</i> : (verbascoside)	↓ : sévérité de la colite, sécrétion IL-10, TNF- α , IFN- γ et GM-CSF par les cellules des ganglions mésentériques - : activité MPO	Souris	DSS (3% - 7j)	600 μ g/j i.p. (j3 à j7)	Hausmann <i>et al.</i> (2007)
Extrait méthanolique de <i>Plantago lanceolata</i> : (verbascoside)	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, sécrétion dose dépendante IFN- γ par les cellules des ganglions mésentériques	Souris	DSS (3% - 7j) x 4	120-600 μ g/j i.p. (5j, 2 sem après ii)	Hausmann <i>et al.</i> (2007)
Verbascoside produit <i>in vitro</i> par des cellules de <i>Syringa vulgaris</i>	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, dose dépendante TNF- α et IL-1 β , TBARS, expression iNOS, ICAM1 et P-sélectine (uniquement à 2mg/kg), activation NF- κ B	Rat	DNBS (25mg)	2 et 0,2 mg/kg/j v.o. (3h après ii)	Mazzon <i>et al.</i> (2009)
Extrait de polyphénols du thé vert (>95% polyphénols totaux)	↓ : sévérité de la colite, taux SAA et TNF- α ↑ : GSH colique améliore l'hématocrite	Souris	DSS (4% - 7 j)	Dose non précisée (10j)	Oz <i>et al.</i> (2005)
Lyophilisat de pommes Marie Ménard : 36 mg/g de polyphénols dont 26 mg/g de proanthocyanidines	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, expression ARNm COX-2 et iNOS	Rat transgénique HLA-B27		7,6% dans le régime (12 sem)	Castagnini <i>et al.</i> (2009)
Lyophilisat d'infusé de <i>Turnera ulmifolia</i> : flavonoïdes	- : activité MPO ↓ : altérations macroscopiques (250 et 500 mg/kg) ↑ : GSH colique (250 et 500 mg/kg)	Rat	TNBS (10 mg)	100 , 250, 500 et 1000 mg/kg/j v.o. (3 j avant ii et 2 à 24 h après ii)	Galvez <i>et al.</i> (2006)
Polyphénols du vin rouge (3,2 g / 100 ml) : acides phénoliques, stilbènes, flavonoïdes	↓ : sévérité de la colite, activités MPO, CuZnSOD, CINC et TNF- α coliques ↑ : IL-10 et GSH colique - : activité MnSOD	Rat	Déficiencia en zinc (1 mg/kg régime – 20 ou 40 j)	250 et 500 mg/kg/j v.o. (3j avant ii, 2 ou 24 h après ii)	Canali <i>et al.</i> (2000)
Extrait méthanolique de <i>Patrina scabiosaefolia</i> : 26,6 μ g/ml polyphénols totaux, 5,1 μ g/ml flavonoïdes	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, production NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , expression ARNm iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β	Souris	DSS (5% - 7j)	10, 30 et 50 mg/kg/j v.o. pendant 7 j ii	Cho <i>et al.</i> (2010)
Extrait méthanolique de <i>Scutellariae radix</i> : baicaléine, baicaline, wogonine	↓ : sévérité de la colite, activité MPO ↑ : activité des canaux ioniques de la muqueuse	Rat	DSS (4%, 8j)	Extrait à 100 mg/kg/j v.o.	Chung <i>et al.</i> (2007)
Infusion de Rooibos : aspalathine, nothofagine	- : sévérité de la colite, ↓ : saignements rectaux, 8-OH-dG urinaire ↑ : hémoglobine, activité SOD sérique	Rat	DSS (4% par ½ journée, 21j)	Infusion de Rooibos comme boisson <i>ad libitum</i> 4 sem avt ii et pendant ii	Baba <i>et al.</i> (2009)

Tableau 10. Effets d'extraits végétaux riches en polyphénols sur les modèles expérimentaux d'inflammation *in vivo* (suite)

Extraction par évaporation de <i>Mangifera indica</i> L. (MIE) en suspension dans la carboxyméthylcellulose	↓ : sévérité de la colite, activité MPO, expression iNOS, diarrhée, TBARS et expression COX-2 (uniquement si traitement préventif), taux TNF- α et IL-6 sérique ↑ : GSH (uniquement si traitement préventif)	Rat	DSS (4%, 7 j)	MIE 150 mg/kg/j v.o. 2 sem avant et pendant ii ou pendant ii uniquement	Marquez <i>et al.</i> (2010)
Extrait de grenade riche en ellagitanins	↓ : sévérité de la colite, TBARS colique, production NO et PGE ₂ , expression ARNm iNOS et COX-2, expression protéines COX-2 et PTGES ↑ : pouvoir antioxydant du plasma	Rat	DSS (5% - 5 j)	250 mg/kg/j dans le régime (25 j avant ii et pendant 5 j avec ii)	Larrosa <i>et al.</i> (2010)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; - , absence d'effet ; v.o., voie orale ; ii, inducteur d'inflammation ; ip, injection intrapéritonéale ; CINC, cytokine induced neutrophil chemoattractant ; COX-2, cyclooxygénase-2 ; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor ; GSH, glutathion ; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1 ; ; IFN- γ , interféron γ ; iNOS, nitrique oxyde synthase inductible ; MPO, myéloperoxydase ; NF- κ B, nuclear factor κ B ; SAA, serum amyloid A ; SOD, superoxyde dismutase ; TBARS, thiobarbituric reactive substances ; TNF- α , tumor necrosis factor α ; 8-OH-dG, 8-hydroxy-2' déoxyguanosine.

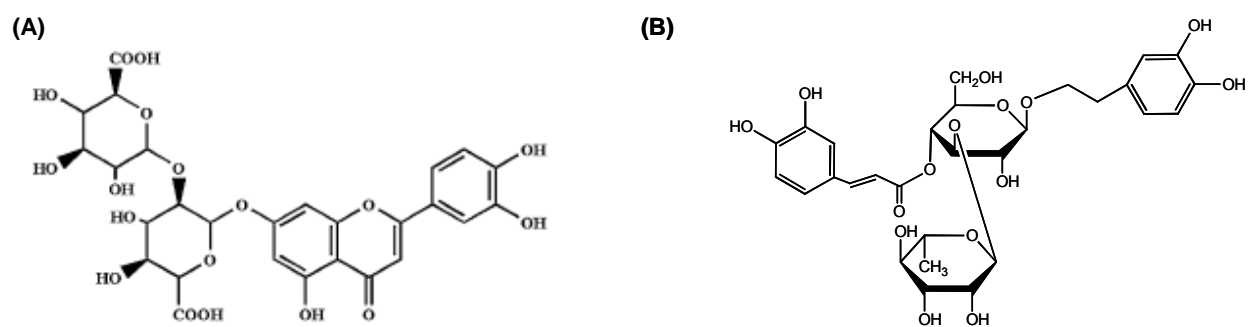


Figure 38. Structure des principaux polyphénols présents dans l'infusé de verveine odorante.

(A) lutéoline 7-diglucuronide ; (B) verbascoside.

Tableau 11. Gradients d'élution des polyphénols.

Etape	Durée (min)	Gradient A		Gradient B	
		Solvant A	Solvant B	Solvant A	Solvant B
0	10,0	95	5	90	10
1	40,0	75	25	70	30
2	5,0	50	50	50	50
3	5,0	95	5	90	10

Gradient A d'élution des acides phénoliques complexes ; gradient B d'élution des flavones ; solvant A, eau/H₃PO₄ (99 /1) ; solvant B, acétonitrile.

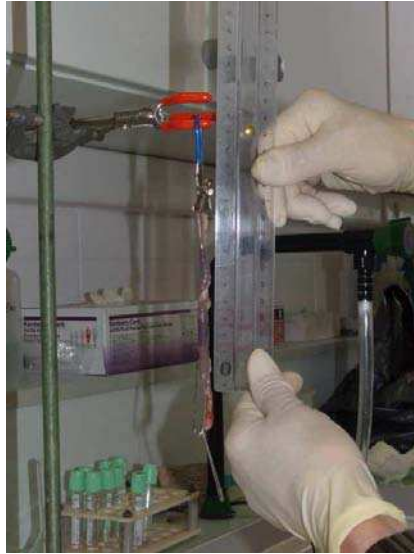


Figure 39. Mesure de la longueur du côlon.



Figure 40. Fixation du prélèvement de côlon destiné à l'analyse histologique.



Figure 41. Section longitudinale du côlon.

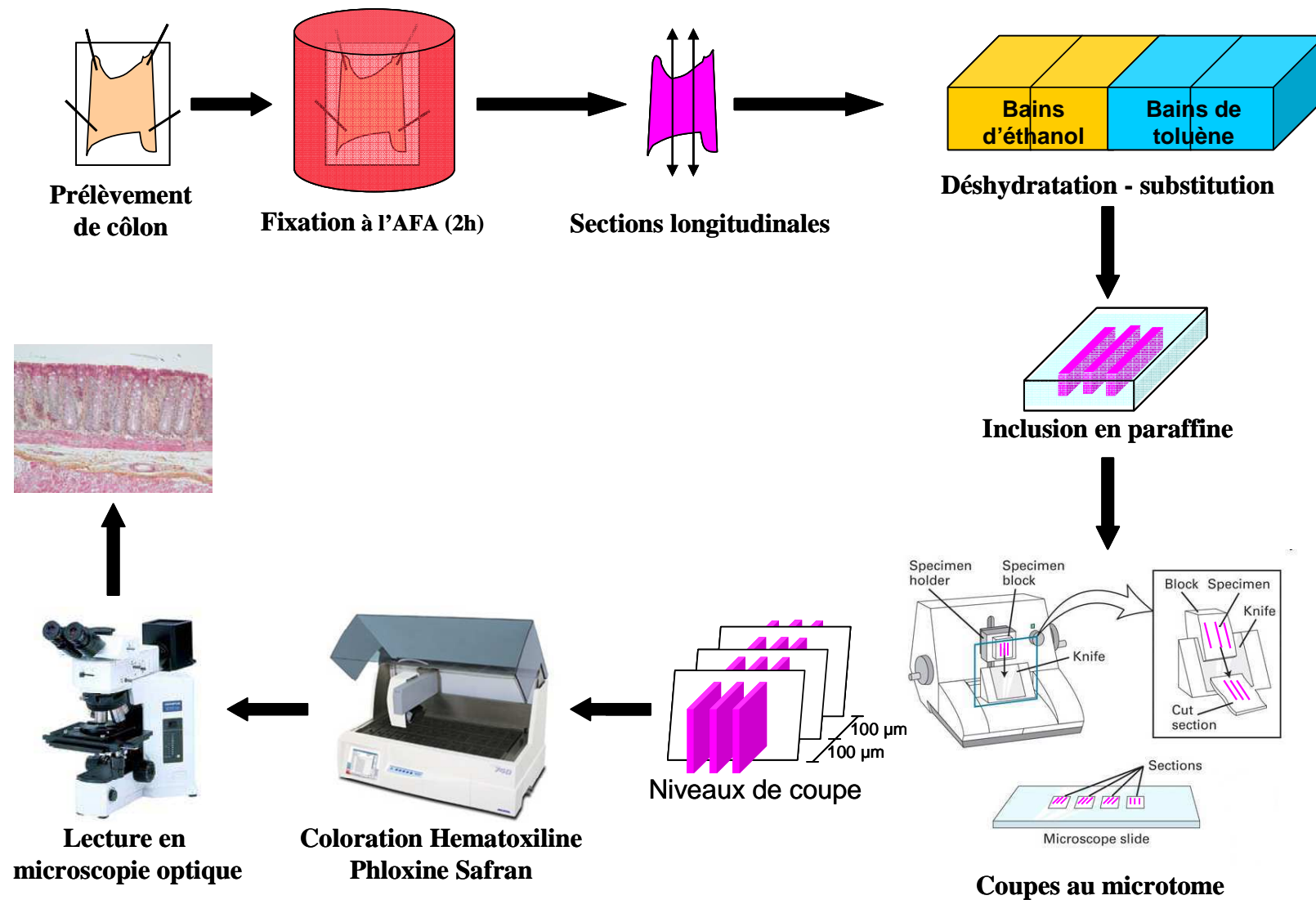


Figure 42. Méthode de préparation des échantillons pour l'analyse histologique

Tableau 12. Grille d'évaluation des atteintes histologiques.*Score des atteintes histologiques*

Lame n° :

Rat n° :

Groupe :

Paramètre	Description du paramètre	Score A				Score B				Score C			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
1	destruction de l'épithélium et des glandes (fibrose)												
2	dilatation des cryptes et mucus épais												
3	infiltration du chorion par les polynucléaires												
4	œdème												
5	congestion vasculaire												
6	décollement dystrophique de l'épithélium de surface												
7	ulcération												
8	infiltration par les cellules mononuclées												
Total													

0 : absence

1 : présence focale

2 : étendu sur une coupe, ± focale sur les deux autres

3 : étendu sur les trois coupes

Si destruction complète de l'épithélium score 1 = 14 et score 7 multiplié par 2

Paramètre	Description du paramètre	Score		
		A	B	C
9	Profondeur de l'inflammation:			
	aucune	0		
	limitée à la muqueuse	1		
	étendue à la sous-muqueuse	2		
	extension transmurale	3		
Total				

	A	B	C
Total			
Score moyen			

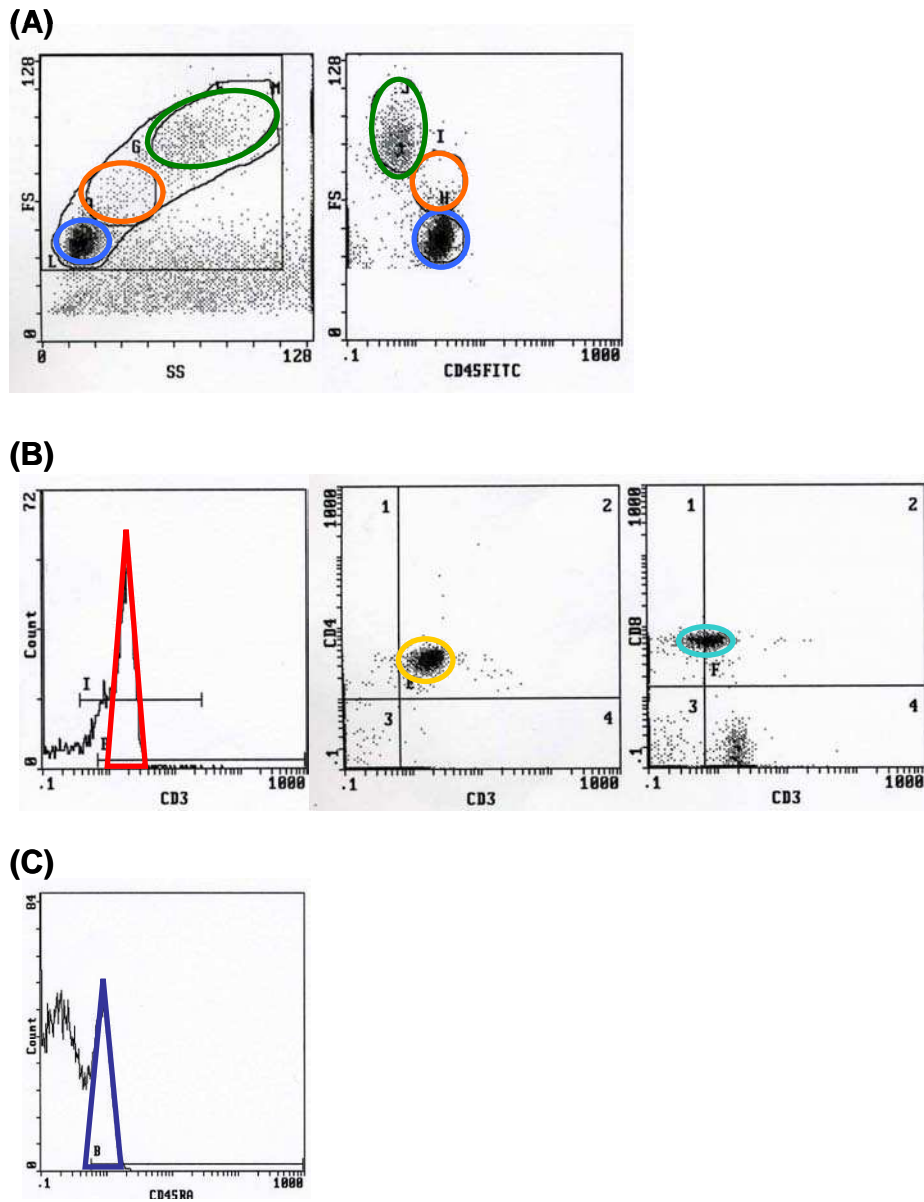


Figure 43. Fenêtres de quantification des populations leucocytaires par cytométrie en flux. (A) quantification des leucocytes (CD45+) en fonction de la taille et de la structure cellulaire : — lymphocytes; — monocytes ; — polynucléaires. (B) quantification des lymphocytes T par triple marquage (CD3+ / CD4+ / CD8+) : — lymphocytes T totaux (CD3+) ; — lymphocytes T helpers (CD3+ / CD4+) ; — lymphocytes T cytotoxiques (CD3+ / CD8+). (C) quantification des lymphocytes B (CD45RA+) —.

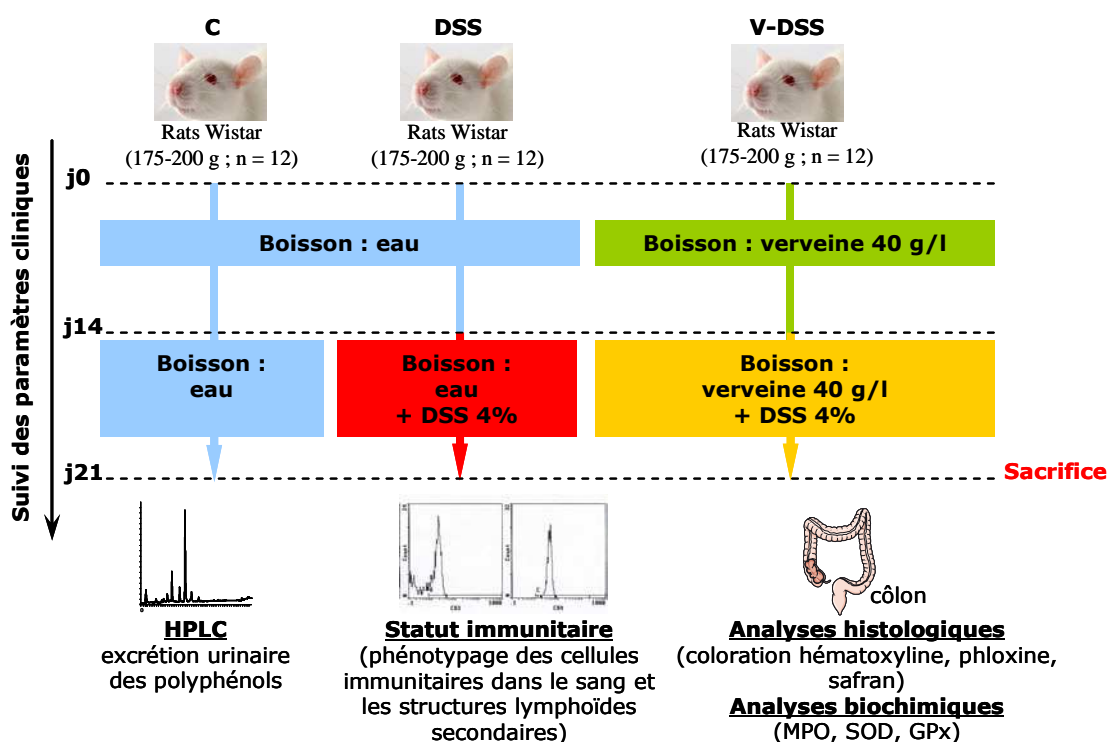


Figure 44. Schéma expérimental de l'étude 1.

Schéma expérimental mis en place pour étudier l'effet d'une consommation préventive d'infusé de verveine odorante à 40 g/l sur l'inflammation intestinale. C, groupe contrôle ; DSS, groupe DSS ; V-DSS, groupe verveine plus DSS ; GPx, glutathion peroxydase ; MPO, myéloperoxydase ; SOD, superoxyde dismutase.

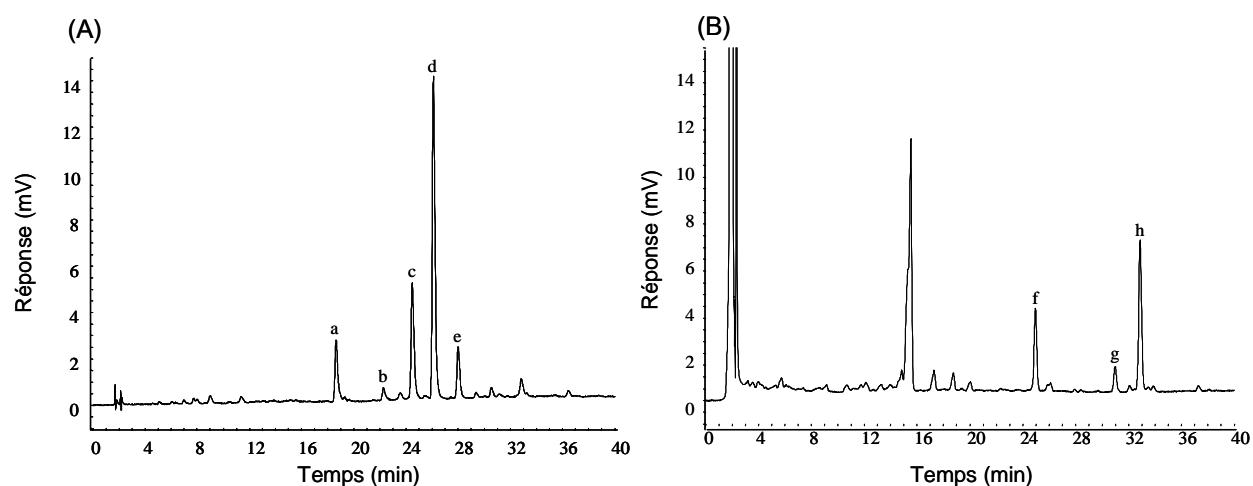


Figure 45. Analyse HPLC de l'infusé de verveine odorante.

(A). Infusé de verveine odorante. Gradient d'élution A, détection à 320 nm. a : lutéoline 7-diglucuronide ; b : glycoside d'apigénine ; c : glycoside de diosmétine ; d : verbascoside ; e : isoverbascoside. (B) Infusé de verveine odorante hydrolysé par la β -glucuronidase/sulfatase. Gradient d'élution B, détection à 350 nm. f : lutéoline ; g : apigénine ; h : diosmétine.

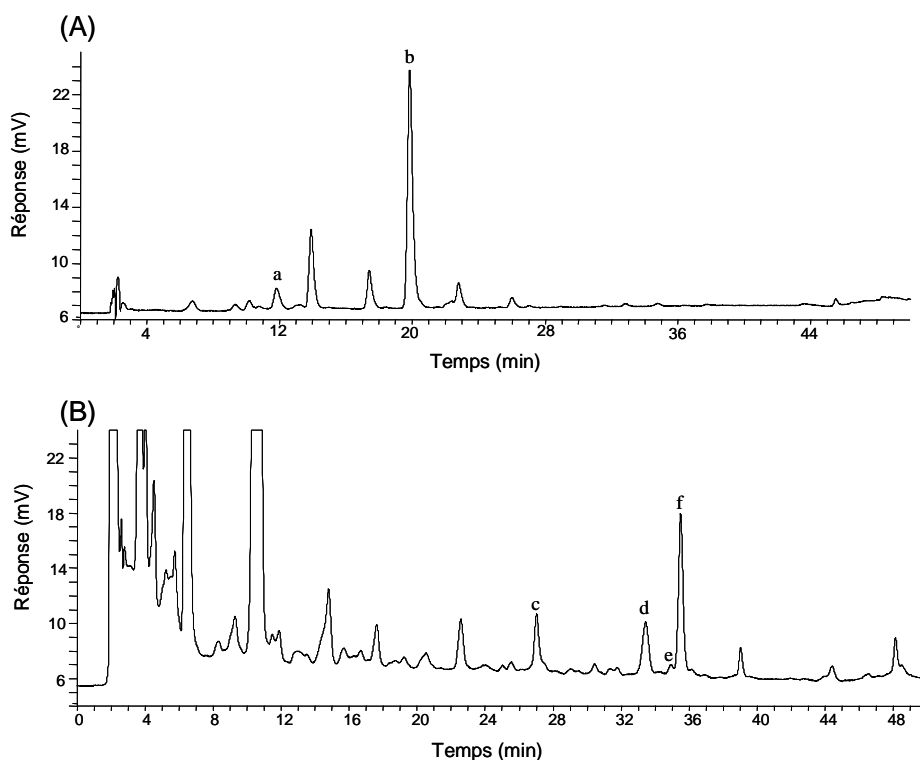


Figure 46. Analyse HPLC des urines après consommation de l'infusé de verveine odorante.

(A) Urine hydrolysée par la β -glucuronidase/sulfatase. Gradient d'élution A, détection à 320 nm. a : acide caféique + impureté ; b : acide férulique. (B) Urine hydrolysée par la β -glucuronidase/sulfatase. Gradient d'élution B, détection à 350 nm. c : lutéoline ; d ; apigénine + impureté ; e : chrysoériol ; f : diosmétine.

Tableau 13. Concentration en polyphénols dans l'infusé de verveine odorante consommé le jour des recueils urinaires.

Concentration en polyphénols (mM)	Avant DSS (J14)	Après DSS (J21)
Verbascoside	1,27	1,32
Isoverbascoside*	0,544	0,584
Lutéoline 7-diglucuronide [#]	0,240	0,224
Glycoside d'apigénine [#]	0,049	0,047
Glycoside de diosmétine [#]	0,70	0,66

* exprimé en verbascoside

[#] exprimés en équivalents de génines**Tableau 14.** Polyphénols consommés les jours de recueil urinaire.

Polyphénols consommés (μmol/24h)	Avant DSS (J14)	Après DSS (J21)
Verbascoside	33,8 ± 1,2	40,9 ± 5,5
Isoverbascoside	14,4 ± 0,5	18,0 ± 2,4
Acides phénoliques complexes totaux	48,2 ± 1,7	58,9 ± 7,9
Lutéoline 7-diglucuronide	6,57 ± 0,23	7,05 ± 0,95
Glycoside d'apigénine	1,30 ± 0,05	1,45 ± 0,20
Glycoside de diosmétine	18,8 ± 0,7	20,6 ± 2,8
Flavones totales	26,6 ± 0,9	29,1 ± 3,9
Polyphénols totaux*	74,8 ± 2,6	88,0 ± 11,8

Moyenne ± ESM (n = 5).

* Polyphénols totaux = acides phénoliques complexes + flavones

Tableau 15. Excrétion urinaire des polyphénols avant et après administration de DSS.

Excrétion urinaire des polyphénols (nmol/24h)	Avant DSS (J14)	Après DSS (J21)
Verbascoside	52,2 ± 7,8	40,9 ± 2,7
Isoverbascoside	16,8 ± 4,6	12,0 ± 3,4
Acides phénoliques complexes totaux	69,0 ± 12,1	52,9 ± 5,5
Lutéoline	22,8 ± 4,5	12,4 ± 3,0
Chrysoériol	12,2 ± 1,5	8,24 ± 1,32
Diosmétine	154 ± 16	166 ± 20
Flavones totales	189 ± 17	186 ± 23
Polyphénols totaux*	258 ± 24	239 ± 27

Moyenne ± ESM (n = 5).

* Polyphénols totaux = acides phénoliques complexes + flavones

Tableau 16. Bilan d'excrétion urinaire.

Excrétion urinaire (%)	Avant DSS (J14)	Après DSS (J21)
Acides phénoliques complexes totaux	0,144 ± 0,024	0,099 ± 0,018
Flavones totales	0,712 ± 0,058	0,673 ± 0,085
Polyphénols totaux	0,346 ± 0,030	0,288 ± 0,038

Quantité de polyphénols excrétés dans les urines rapportée à la quantité ingérée (%)

Moyenne ± ESM (n = 5).

Tableau 17. Numération des leucocytes sanguins.

Groupes	Numération (10^6 cellules/ml de sang)			
	Leucocytes	Lymphocytes	Monocytes	Cellules polynucléaires
C	$4,16 \pm 0,37$	$3,24 \pm 0,36$	$0,199 \pm 0,032$	$0,716 \pm 0,052$
DSS	$3,24 \pm 0,44$	$2,36 \pm 0,33$	$0,162 \pm 0,025$	$0,718 \pm 0,103$
V-DSS	$5,35 \pm 0,79^\dagger$	$4,21 \pm 0,67^\dagger$	$0,245 \pm 0,041$	$0,894 \pm 0,128$
Groupes	Sous - populations lymphocytaires (10^6 cellules/ml de sang)			
	Cellules B (CD45RA+)	Cellules T (CD3+)	Cellules Th (CD3+/CD4+)	Cellules Tc (CD3+/CD8+)
C	$0,395 \pm 0,074$	$1,39 \pm 0,18$	$1,13 \pm 0,15$	$0,232 \pm 0,032$
DSS	$0,413 \pm 0,110$	$1,16 \pm 0,19$	$0,963 \pm 0,159$	$0,186 \pm 0,030$
V-DSS	$0,798 \pm 0,181^{*,\dagger}$	$1,79 \pm 0,25^\dagger$	$1,43 \pm 0,21$	$0,326 \pm 0,038^{*,\dagger\dagger}$

Moyennes \pm ESM (n=12). C, groupe contrôle ; DSS, groupe DSS ; V-DSS, groupe verveine plus DSS. *, vs C ($p < 0,05$) ; † , vs DSS ($p < 0,05$) ; †† , vs DSS ($p < 0,01$) (ANOVA à une voie et test post-hoc LSD de Fisher).

Tableau 18. Sous-populations lymphocytaires dans les structures lymphoïdes secondaires.

Groupes	Sous-populations lymphocytaires dans les plaques de Peyer (%)			
	Cellules T (CD3+)	Cellules B (CD45RA+)	Cellules Th (CD3+/CD4+)	Cellules Tc (CD3+/CD8+)
C	$28,1 \pm 1,3$	$46,5 \pm 3,3$	$89,5 \pm 1,8$	$6,02 \pm 1,07$
DSS	$32,5 \pm 3,1$	$24,4 \pm 3,7^{**}$	$88,9 \pm 2,1$	$7,65 \pm 1,45$
V-DSS	$27,1 \pm 3,9$	$31,9 \pm 5,7^*$	$90,1 \pm 1,1$	$7,10 \pm 0,88$
Groupes	Sous-populations lymphocytaires dans les ganglions mésentériques (%)			
	Cellules T (CD3+) [§]	Cellules B (CD45RA+) [§]	Cellules Th (CD3+/CD4+) [#]	Cellules Tc (CD3+/CD8+) [#]
C	$47,4 \pm 4,5$	$21,9 \pm 2,6$	$87,8 \pm 1,9$	$9,20 \pm 1,22$
DSS	$49,8 \pm 2,3$	$14,6 \pm 1,9^*$	$93,6 \pm 0,9^*$	$5,09 \pm 0,78^{**}$
V-DSS	$49,3 \pm 3,1$	$15,2 \pm 1,5^*$	$87,4 \pm 1,7^{\dagger\dagger}$	$10,10 \pm 1,19^{\dagger\dagger}$

Moyennes \pm ESM (n=12). C, groupe contrôle ; DSS, groupe DSS ; V-DSS, groupe verveine plus DSS. *, vs C ($p < 0,05$) ; **, vs C ($p < 0,01$) ; † , vs DSS ($p < 0,05$) ; †† , vs DSS ($p < 0,01$) (ANOVA à une voie et test post-hoc LSD de Fisher).

[§] exprimé en pourcentage de cellules CD45+. [#] exprimé en pourcentage de cellules CD3+.

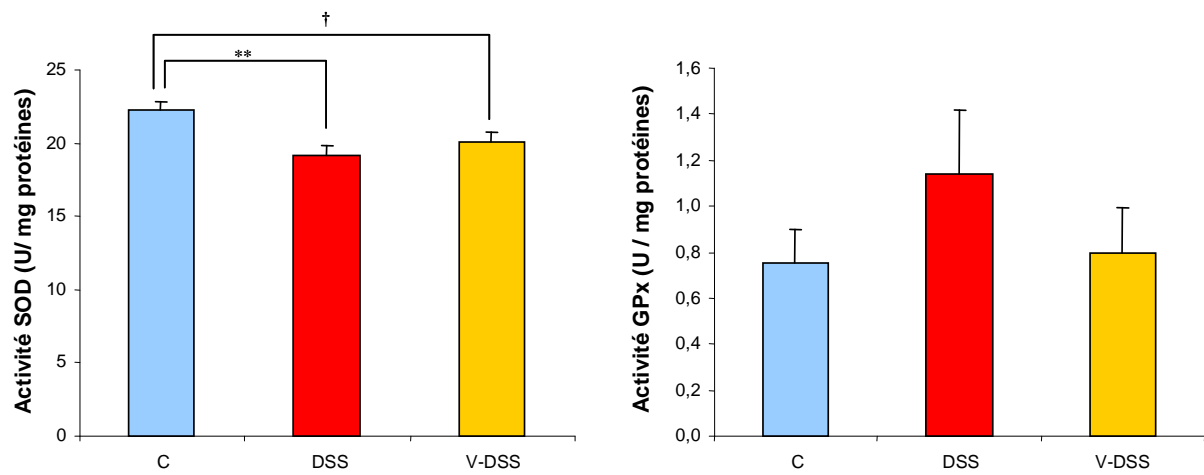


Figure 47. Activités SOD et GPx dans la muqueuse colique.

Moyenne \pm ESM ($n = 6$). C, groupe contrôle, DSS, groupe DSS, V-DSS, groupe verveine plus DSS. **, $p < 0,01$; †, $p < 0,05$ (ANOVA à une voie et test post-hoc LSD de Fisher).

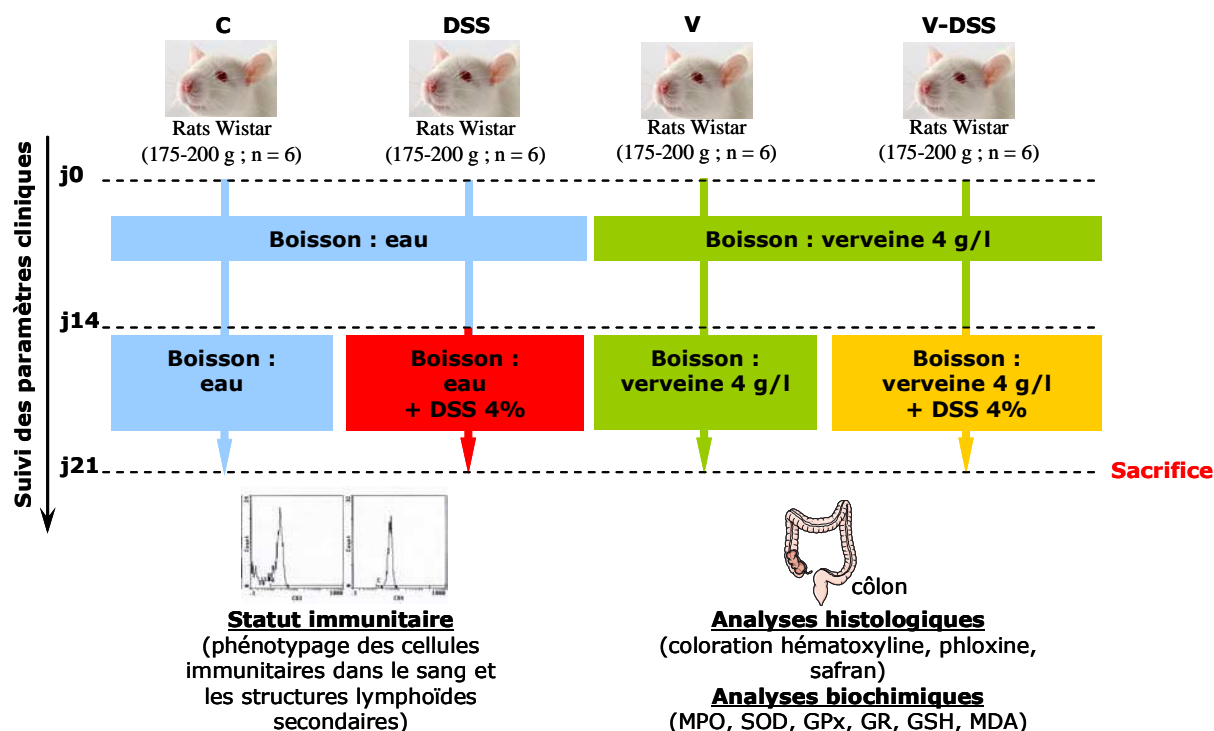


Figure 48. Schéma expérimental de l'étude 2.

Schéma expérimental mis en place pour étudier l'effet d'une consommation préventive d'infusé de verveine odorante à 4 g/l sur l'inflammation intestinale. C, groupe contrôle ; DSS, groupe DSS ; V, groupe verveine ; V-DSS, groupe verveine plus DSS ; GPx, glutathion peroxydase ; GR, glutathion réductase ; GSH, glutathion ; MDA, malondialdéhyde ; MPO, myéloperoxydase ; SOD, superoxyde dismutase.

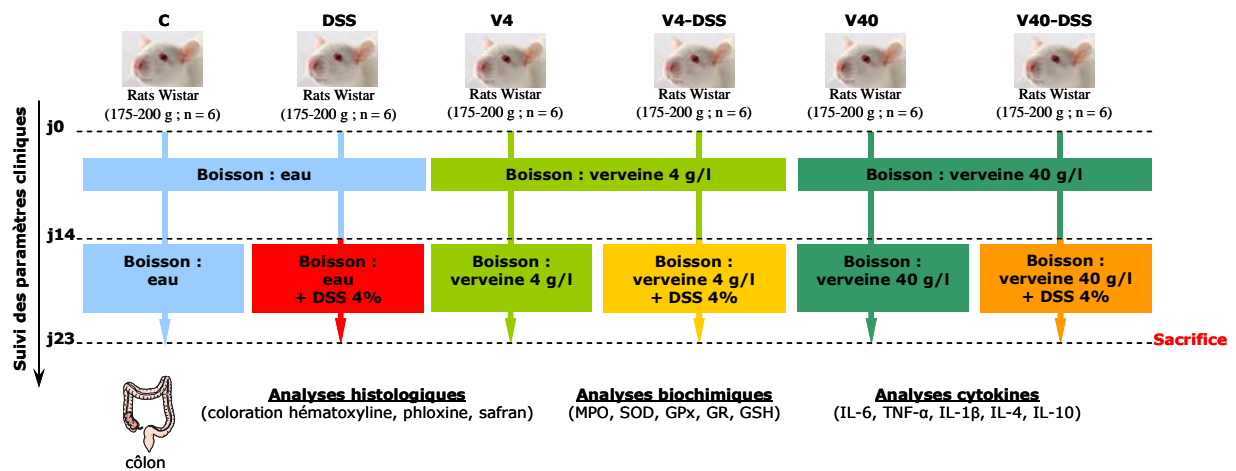


Figure 49. Schéma expérimental de l'étude 3.

Schéma expérimental mis en place pour étudier l'effet d'une consommation préventive d'infusés de verveine odorante à 4 g/l et 40g/l sur l'inflammation intestinale. C, groupe contrôle ; DSS, groupe DSS ; V4, groupe verveine 4 g/l; V4-DSS, groupe verveine 4 g/l plus DSS ; V40, groupe verveine 40 g/l; V40-DSS, groupe verveine 40 g/l plus DSS ; GPx, glutathion peroxydase ; GR, glutathion réductase ; GSH, glutathion ; MPO, myéloperoxydase ; SOD, superoxyde dismutase ; IL, interleukine ; TNF, tumor necrosis factor.

Tableau 19 Concentration en polyphénols des infusés de verveine odorante.

Concentration en polyphénols (µM)	Verveine 4 g/l	Verveine 40 g/l
Verbascoside	64,0	961
Isoverbascoside*	21,4	511
Lutéoline 7-diglucuronide [#]	11,3	170
Glycoside d'apigénine [#]	1,91	25,7
Glycoside de diosmétine [#]	40,3	604
Polyphénols totaux	149	2272

* exprimé en verbascoside, [#] exprimés en équivalents de génines

Tableau 20. Consommation d'infusé de verveine odorante et de polyphénols^(a).

Groupes	V4	V4-DSS	V40	V40-DSS
Consommation moyenne d'infusé (ml/j)	27,6 ± 2,0	27,9 ± 1,0	30,6 ± 1,0	36,5 ± 0,8**
Polyphénols consommés (µmol/j)				
Verbascoside	1,77 ± 0,13	1,78 ± 0,07	29,4 ± 0,9	35,0 ± 0,7
Isoverbascoside	0,592 ± 0,043	0,597 ± 0,021	15,6 ± 0,5	18,7 ± 0,4
Lutéoline 7-diglucuronide	0,311 ± 0,023	0,314 ± 0,012	5,21 ± 0,16	6,22 ± 0,13
Glycoside d'apigénine	0,053 ± 0,003	0,053 ± 0,002	0,786 ± 0,025	0,938 ± 0,020
Glycoside de diosmétine	1,11 ± 0,08	1,12 ± 0,04	18,5 ± 0,6	22,0 ± 0,5
Consommation moyenne de polyphénols totaux (µmol/j)	3,84 ± 0,28	3,87 ± 0,14	69,4 ± 2,2	82,9 ± 1,8**

^(a) Consommation moyenne déterminée durant les 9 derniers jours de l'expérimentation.

V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS. **, V40-DSS vs autres groupes (p < 0,01).

Tableau 21. Consommation alimentaire et gain de poids corporel^(a).

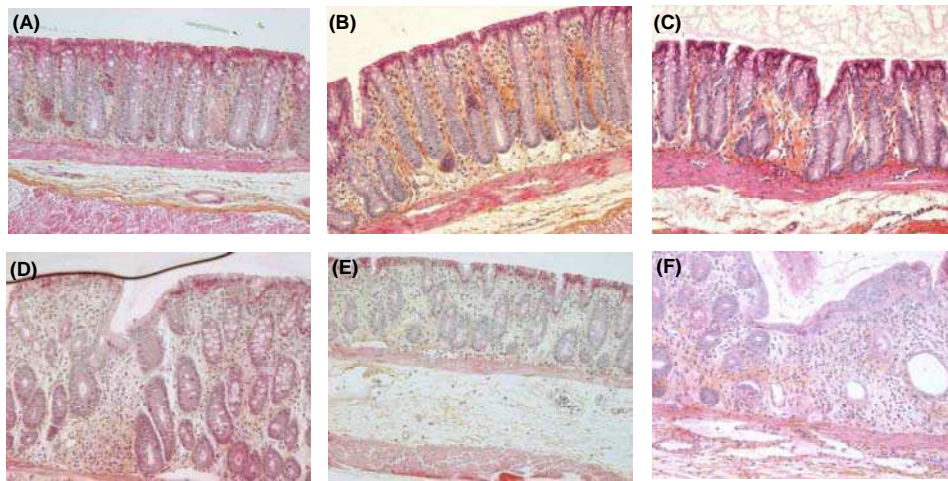
Groupes	Consommation alimentaire (g)	Gain de poids (%)
C	238 ± 8	11,1 ± 0,6
V4	228 ± 7	10,6 ± 0,9
V40	222 ± 9	11,8 ± 0,6
DSS	220 ± 5*	5,77 ± 1,25**
V4-DSS	200 ± 4 ^{††}	6,80 ± 0,61 ^{††}
V40-DSS	211 ± 2	7,01 ± 1,99 ^{‡‡}

^(a) Les données correspondent aux 9 derniers jours d'expérimentation. Moyennes ± ESM (n = 6). C, groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS. *, vs C (p < 0,05) ; **, vs C (p < 0,01) ; ^{††}, vs V4 (p < 0,01) ; ^{‡‡}, vs V40 (p < 0,01).

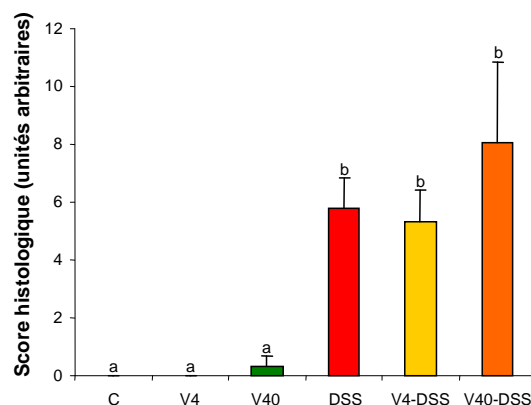
Tableau 22. Longueur du côlon et poids des organes.

Groupes	Longueur du côlon (cm)	Poids du thymus (g)	Poids de la rate (g)	Poids du foie (g)
C	18,5 ± 0,8	0,77 ± 0,04	1,00 ± 0,03	12,5 ± 0,7
V4	18,7 ± 0,8	0,79 ± 0,06	0,95 ± 0,03	10,5 ± 0,5
V40	18,0 ± 0,3	0,75 ± 0,03	0,89 ± 0,02	10,6 ± 0,6
DSS	15,2 ± 0,3 ^{**}	0,86 ± 0,05	0,95 ± 0,04	10,6 ± 0,2
V4-DSS	16,3 ± 0,5 ^{††}	0,80 ± 0,06	1,02 ± 0,07	9,84 ± 0,31
V40-DSS	16,9 ± 0,4 [#]	0,73 ± 0,04	1,16 ± 0,17 [‡]	10,8 ± 0,2

Moyennes ± ESM (n = 6). C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS.
^{**}, vs T (p < 0,01) ; ^{††}, vs V4 (p < 0,01) ; [‡], vs V40 (p < 0,05) ; [#], vs DSS (p < 0,05).

**Figure 50.** Altérations histologiques de la muqueuse colique.

(A) groupe contrôle ; (B) groupe V4 ; (C) groupe V40 ; (D) groupe DSS ; (E) groupe V4-DSS ; (F) groupe V40-DSS. Coloration HPS ; grossissement x 20.

**Figure 51.** Score histologique de la muqueuse colique.

Moyenne ± ESM (n = 6). Test non paramétrique de Mann-Whitney (p < 0,05). C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS. Les moyennes sans lettre commune diffèrent significativement (p < 0,05).

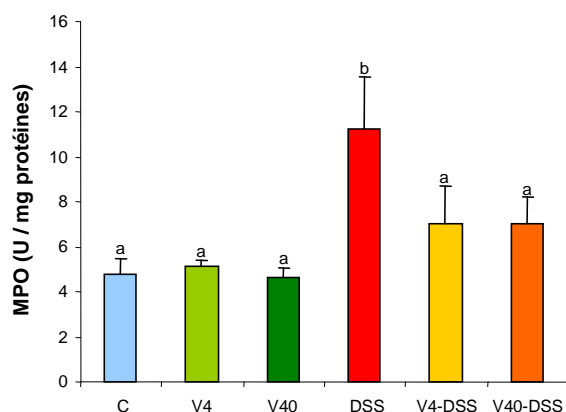


Figure 52. Activité MPO dans la muqueuse colique.

Moyenne \pm ESM (n = 6). Test LSD de Fisher ($p < 0,05$). C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS. Les moyennes sans lettre commune diffèrent significativement ($p < 0,05$).

Tableau 23. Activité des enzymes antioxydantes dans le côlon.

Groupes	SOD (U/mg protéines)	CAT (U/mg protéines)	GPx (U/mg protéines)	GR (U/mg protéines)
C	13,8 \pm 0,6	57,7 \pm 3,2	0,609 \pm 0,057	0,131 \pm 0,009
V4	11,7 \pm 0,3*	56,7 \pm 8,2	0,581 \pm 0,042	0,113 \pm 0,003**
V40	13,1 \pm 0,5	58,8 \pm 3,0	0,654 \pm 0,073	0,110 \pm 0,002**
DSS	14,0 \pm 1,5	61,7 \pm 5,9	0,602 \pm 0,062	0,108 \pm 0,002**
V4-DSS	10,6 \pm 0,4##	53,2 \pm 5,0	0,627 \pm 0,073	0,125 \pm 0,002##
V40-DSS	12,6 \pm 0,5	56,4 \pm 4,9	0,633 \pm 0,031	0,122 \pm 0,004#

Moyennes \pm ESM (n = 6)

C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS. **, vs T ($p < 0,01$) ; #, vs DSS ($p < 0,05$) ; ##, vs DSS ($p < 0,01$).

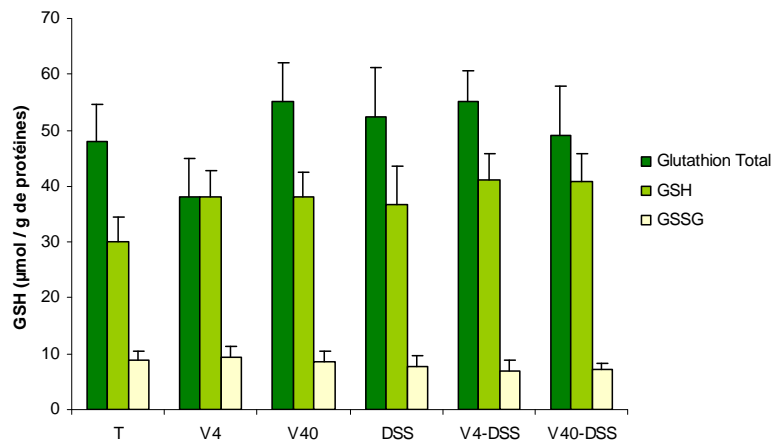


Figure 53. Taux de glutathion total, de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG) dans la muqueuse colique.

Moyenne \pm ESM (n = 6). C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS.

Tableau 24. Dosage des cytokines dans le côlon.

Groupe	IL-6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ prot)	TNF- α (pg/mg prot)	IL-1 β (pg/mg prot)	IL-4 (pg/mg prot)	IL-10 (pg/mg prot)
C	1,47 \pm 0,14	122 \pm 10	507 \pm 44	11,2 \pm 1,0	177 \pm 12
V4	1,37 \pm 0,08	95,3 \pm 9,3	440 \pm 39	8,66 \pm 0,84	168 \pm 18
V40	1,51 \pm 0,17	104 \pm 15	425 \pm 34	9,75 \pm 1,85	187 \pm 29
DSS	1,12 \pm 0,13	104 \pm 11	455 \pm 34	9,98 \pm 0,67	174 \pm 15
V4-DSS	1,14 \pm 0,12	89,9 \pm 9,5	491 \pm 62	7,42 \pm 0,94	146 \pm 20
V40-DSS	0,979 \pm 0,132 ^{††}	82,1 \pm 13,5 [#]	387 \pm 31	7,88 \pm 0,63	134 \pm 13

Moyennes \pm ESM (n = 6). C groupe contrôle ; V4, groupe verveine-4 ; V40, groupe verveine-40 ; DSS, groupe DSS ; V4-DSS, verveine-4 plus DSS ; V40-DSS, verveine-40 plus DSS ; prot, protéines.

^{††}, vs V40 (p < 0,01); [#], vs DSS (p < 0,05).

Tableau 25. Comparaison des teneurs et consommations de polyphénols au cours des trois études.**Teneurs en polyphénols dans les infusés des différentes études**

		Etude n°1	Etude n°2	Etude n°3	
		V40	V4	V40	V4
Acides phénoliques complexes	Verbascoside (mg/l)	756	41,2	600	39,9
	Isoverbascoside (mg/l)	288	13,7	319	13,4
Dérivés de flavones	Glycoside de diosmétine (mg/l)	288	32,2	279	18,6
	Lutéoline-7-diglucuronide (mg/l)	156	16,1	109	7,17
	Glycoside d'apigénine (mg/l)	18,2	1,60	11,1	0,83
Concentration en polyphénols totaux (g/l)		1,51	0,105	1,32	0,080

Consommation journalière en polyphénols dans les différentes études:

		Etude n°1	Etude n°2	Etude n°3			
		V40	V4	V40	V40-DSS	V4	V4-DSS
Acides phénoliques complexes	Verbascoside (mg/j)	23,9	1,23	18,4	21,9	1,1	1,11
	Isoverbascoside (mg/j)	9,10	0,399	9,8	11,7	0,369	0,330
Dérivés de flavones	Glycoside de diosmétine (mg/j)	9,10	0,970	8,54	10,2	0,514	0,520
	Lutéoline-7-diglucuronide (mg/j)	4,94	0,478	3,32	3,97	0,198	0,200
	Glycoside d'apigénine (mg/j)	0,575	0,048	0,340	0,410	0,023	0,023
Consommation de polyphénols totaux (mg/j)		47,6	3,12	40,4	48,17	2,20	2,18
Consommation de polyphénols totaux (mg/j/kg)		132	8,94	125,9	150,2	6,67	7,11

Extrapolation des doses chez l'Homme :

		Etude n°1	Etude n°2	Etude n°3		
		V40	V4	V40	V40-DSS	V4
Dose de polyphénols chez l'Homme en mg/j		952	62,5	808	963	44,1

V40, groupe verveine-40 ; V40-DSS, groupe verveine-40 plus DSS ; V4, groupes verveine-4 ; V4-DSS, groupe verveine-4 plus DSS.